



**ใบรับรองวิทยานิพนธ์**  
**บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์)

**ปริญญา**

กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์

กายวิภาคศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของการเก็บรักษาโอโอไซต์ของสุนัขภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดเยือกแข็งที่มีผลต่อลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ Cumulus-oocyte complexes

Effect of Cryopreservation of Canine Oocyte on Histological Characteristics of the Cumulus-oocyte complexes

นามผู้วิจัย นางสาวชลธิชา ศรีรุ่งเรือง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริรักษ์ จันทกร, Ph.D )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( รองศาสตราจารย์เกษกนก ศิรินฤมิตร, Ph.D )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุไร พงศ์ชัยฤกษ์, Ph.D )

หัวหน้าภาควิชา

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุไร พงศ์ชัยฤกษ์, Ph.D )

**บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว**

( รองศาสตราจารย์ ดร. กัญจนา วีระกุล M.A. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของการเก็บรักษาโอโอไซต์ของสุนัขภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดเยือกแข็งที่มีต่อ  
ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ cumulus-oocyte-complexes

Effect of Cryopreservation of Canine Oocyte on Histological Characteristics  
of the Cumulus-oocyte complexes

โดย

นางสาวชลธิชา ศรีรุ่งเรือง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์)

พ.ศ. 2555

ชลธิชา ศรีรุ่งเรือง 2555: ผลของการเก็บรักษาโอโอไซต์ของสุนัขภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดเยือกแข็งที่มีต่อลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ cumulus-oocyte complexes ปรินญาญวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์) สาขากายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริรักษ์ จันทกรู, Ph.D. 88 หน้า

วัตถุประสงค์หลักคือการรักษาคุณภาพของโอโอไซต์โดยการแช่แข็ง ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ cumulus-oocyte complexes (COCs) ที่เกิดจากการแช่แข็งจึงทำให้มีผลกระทบต่อบทบาทหน้าที่และกระบวนการปฏิสนธิ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อตรวจสอบผลกระทบของการแช่แข็งโดยวิธีวิทริฟิเคชัน (Solid surface vitrification, SSV) ที่มีต่ออัตราการรอดชีวิตและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ COCs ของสุนัข และศึกษาถึงการกระจายของคาร์โบไฮเดรตตามคุณสมบัติการจับของเลคติน COCs ทั้งหมดคัดเลือกรวมมาจากสุนัขโดยทำการแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม โดยทุกกลุ่มการทดลองยกเว้นกลุ่มควบคุมนำมาแช่ใน vitrification medium ที่แตกต่างกัน vitrification medium ประกอบด้วย TCM 199 medium และเสริมด้วย trehalose 0.5 โมลาร์, ethylene glycol (EG) 1.5 โมลาร์ และ fetal bovine serum (FBS) 20 เปอร์เซ็นต์ นำมาใช้สำหรับ COCs ของกลุ่ม 2 และ 4 ในขณะที่ vitrification medium ที่ประกอบด้วย TCM 199 medium เสริมด้วย trehalose 0.5 โมลาร์, EG 3 โมลาร์ และ FBS 20 เปอร์เซ็นต์ ใช้สำหรับ COCs กลุ่ม 3 และ 5 COCs จากกลุ่ม 4 และ 5 นำมาแช่แข็งโดยวิธี SSV ในการศึกษา Lectin histochemistry ใช้เลคติน 6 ชนิด ได้แก่ PSA, S-WGA, LEL, GSL-II, VVA และ ECL โดยใช้ fluorescein-conjugated avidin D และ Rhodamine-conjugated avidin D เข้ามาจับ

ผลการศึกษาพบอัตราการรอดชีวิตของโอโอไซต์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งและผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การฉีกขาดของ oolemma การกระจายของ cumulus cell และการเกิด cytoplasmic vacuole พบในทุกกลุ่มการทดลอง ร้อยละความเสียหายของ COCs ในแต่ละกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม cumulus cell เป็นโครงสร้างที่ถูกผลกระทบมากที่สุดจากการแช่แข็งโดยวิธี SSV ผลจาก lectin histochemistry พบว่าสารป้องกันการแช่แข็ง และ/หรือ การแช่แข็งโดยวิธี SSV มีผลต่อการลดลงต่อการจับของเลคติน PSA ต่อน้ำตาล  $\alpha$ -mannose บน Zona pellucida และ oolemma การแช่แข็งโดยวิธี SSV มีผลทำให้เลคตินไม่สามารถจับกับน้ำตาล N-acetyl glucosamine และ  $\beta$ - $\alpha$ -D-N-acetyl glucosamine ได้ทั้งบน ZP และ oolemma จับติดได้กับคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ของ Cumulus cell, ZP และ oolemma ได้ลดลงเนื่องมาจากผลของ cryoprotectants และ/หรือ SSVs ดังนั้นการสัมผัสกับสารป้องกันการแช่แข็งและการแช่แข็งโดยวิธี SSV อาจมีผลต่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของน้ำตาลใน COCs

Cholticha Srirungruang 2012: Effect of Cryopreservation of Canine Oocyte on Histological Characteristics of the Cumulus-oocyte complexes. Master of Sciences (Veterinary Anatomy), Major Field: Veterinary Anatomy, Department of Anatomy. Thesis Advisor: Assistant Professor Sirirak Chantakru, Ph.D. 88 pages.

The main purpose of cryopreservation of the oocytes is to preserve their qualities. Therefore, any structural changes in cumulus-oocyte complex that might be caused by vitrification will have great effects on functions and fertilization. The objective of the present study was to determine effects of solid surface vitrification (SSV) on viability and morphology of canine cumulus oocyte complexes (COCs), and also on carbohydrate distribution based on lectin-binding properties. All COCs from each dog were randomly divided into five groups. Every group except the control was equilibrated and separately introduced into different recipe of vitrification media. The vitrification medium consisting TCM 199 medium, supplemented with 0.5 M trehalose, 1.5 M ethylene glycol (EG) and 20% fetal bovine serum (FBS) was used for COCs of the groups 2 and 4, whereas the vitrification medium with consisting TCM 199 medium, supplemented with 0.5 M trehalose, 3 M EG and 20% FBS for the groups 3 and 5. Only the COC from groups 4 and 5 were vitrified with SSV. In lectin histochemistry, six biotinylated lectins including PSA, s-WGA, LEL, GSL-II, VVA and ECL were incubated with paraffin-embedded sections. Fluorescein-conjugated Avidin D and Rhodamine-conjugated Avidin D were then applied.

The result showed that the survival rates of non-vitrified and vitrified COCs were not significantly different. Morphological alterations including shrinkage, disrupted oolemma, loss of cumulus cell layer and cytoplasmic vacuolization were common features found in treatment groups. Percentages of COCs with each type of damages were not different. However, cumulus cells appeared to be the structures that were affected most from the SSV. The results from lectin histochemistry showed that cryoprotectants and/or SSV reduced PSA binding to the  $\alpha$ -mannose on the ZP and oolemma. SSV alone caused no binding to N-acetyl glucosamine and  $\alpha$ - and  $\beta$ - $\alpha$ -DN-acetyl glucosamine on both the ZP and oolemma. Lectin binding to carbohydrate residues on cell surface of the cumulus cells, zona pellucida and oolemma was reduced by cryoprotectants and/or SSVs. Thus, exposure of the cryoprotectant and SSV may modify structural changes of sugars in the COCs.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สพ.ญ. ศิริรักษ์ จันทครุ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำ และตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และให้กำลังใจ ให้ความรู้ในการศึกษา การวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สพ.ญ. เกษกนก ศิรินฤมิตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม แห่งภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ผศ.ดร.สพ.ญ. อุไร พงศ์ชัยฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม แห่งภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้กรุณาประสิทธิ์ประสาทวิชาการความรู้อันเป็นพื้นฐานในการทำงานวิจัย รวมถึงให้คำปรึกษาแนะนำ แนวทางการคิดอันเป็นสิ่งบันดาลใจให้ข้าพเจ้าทำวิจัยจนสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณ น.สพ. วุฒิ คงคาชนะ นายสัตวแพทย์ประจำคลินิกสัตวแพทย์ กรุงเทพมหานคร 4 บางเขน ศูนย์บริการสาธารณสุข 24 บางเขน ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างรังไข่ของสุนัขจากการทำหมัน และคุณฉลองชัย คุ้มภัย นักวิชาการสถิติ 6 ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาในการวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลรวมทั้งการแปลผลข้อมูลทางสถิติ และนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการจุลกายวิภาคศาสตร์ ที่คอยช่วยเหลือจัดหาอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ คอยให้คำปรึกษาและให้กำลังใจเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่ข้าพเจ้า ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสมชาย-คุณแม่วรรณา ศรีรุ่งเรือง พี่ชายของข้าพเจ้า และเพื่อนๆทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจอย่างดีเสมอมา ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผลงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาประจำปีงบประมาณ 2553 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ชลธิชา ศรีรุ่งเรือง

มีนาคม 2555

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	28
อุปกรณ์	28
วิธีการ	30
ผลและวิจารณ์	38
ผล	38
วิจารณ์	69
สรุปและข้อเสนอแนะ	74
สรุป	74
ข้อเสนอแนะ	74
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	75
ภาคผนวก	86
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	88

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	โครงสร้างทางกายภาพของ Ethylene glycol (EG)	16
2	วิธีการแช่แข็งแบบวิทริไฟเคชัน โดยใช้อุปกรณ์ต่างๆ	23
3	Lectin และหมู่น้ำตาลที่จับกับ Lectin ที่ใช้ในการทดสอบ	35
4	อัตราการรอดชีวิตของโอโอไซต์ %ค่าเฉลี่ย และ ค่าความแปรปรวน	40
5	ขนาดของโอโอไซต์ และ ความหนาของ zona pellucida	44
6	ร้อยละโอโอไซต์ที่มีความผิดปกติของโครงสร้างต่างๆ	47
7	ผลการติดของ Lectin บน zona pellucida ของโอโอไซต์สุนัข	54
8	ผลการติดของ Lectin บน cumulus cell ของโอโอไซต์สุนัข	55
9	ผลการติดของ Lectin บน zona pellucida ของโอโอไซต์สุนัข	56

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างทางกายวิภาคศาสตร์ของมดลูกสุนัขเพศเมีย	4
2	รังไข่ของสุนัขในระยะโปรเฟส	4
3	กระบวนการเจริญของโอโอไซต์ (Oogenesis) ในสุนัข	6
4	การพัฒนาของฟอลลิเคิล	8
5	โครงสร้างของ cumulus-oocyte complexes	11
6	หมุ่ไข่ที่เป็นน่องค์ประกอบของ Cumulus-Oocyte complexes ในสุนัข	13
7	โครงสร้างทางเคมีทั่วไปของสารกลุ่มสารป้องกันการแช่แข็งชนิดที่ซึมผ่าน	16
8	โอโอไซต์ชนิดที่มี cumulus cell จำนวนหลายชั้นหุ้มล้อมรอบเปลือก zona pellucida	17
9	โอโอไซต์ชนิดที่มี cumulus cell หุ้มหนึ่งถึงสองชั้นรอบเปลือก zona pellucida	18
10	โอโอไซต์ชนิดไม่มี cumulus cell หุ้มล้อมรอบเปลือก zona pellucida	18
11	โอโอไซต์ชนิดที่มี cumulus cell หุ้มกระจายรอบเปลือก zona pellucida	19
12	โอโอไซต์ชนิดที่มีไซโตพลาซึมภายในเสื่อมสลาย	19
13	solid surface vitrification	32
14	โอโอไซต์ที่ย้อมด้วย PI	33
15	การวัดขนาดโอโอไซต์ และ zona pellucida ของสุนัข	36
16	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโอโอไซต์ในแต่ละกลุ่มการทดลองและแสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	39
17	โครงสร้างของ cumulus-oocyte complexes	42
18	ลักษณะของโอโอไซต์ที่ย้อมด้วยสี Hematoxyline & Eosin	45
19	โอโอไซต์ที่ย้อมด้วยสี Periodic acid Schiff	46
20	ร้อยละของ COCs ที่ผนังเซลล์ไข่ (oolemma) ฉีกขาด	48
21	ร้อยละของ COCs ที่เกิด cytoplasmic vacuole	49
22	ร้อยละของ COCs ที่มี cumulus cell ลอกหลุด	50
23	ร้อยละของ COCs ที่ ZP ที่ฉีกขาด	51

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
24	โอโอไซค์ที่ย้อมด้วย Lectin PSA ที่ติดฉลากด้วย Fluorescein Avidin D	57
25	โอโอไซค์ที่ย้อมด้วย Lectin PSA ที่ติดฉลากด้วย Fluorescein Avidin D	58
26	โอโอไซค์ที่ย้อมด้วย Lectin sWGA ที่ติดฉลากด้วย Fluorescein Avidin D	59
27	โอโอไซค์ที่ย้อมด้วย Lectin sWGA ที่ติดฉลากด้วย Rhodamine Avidin D	60
28	โอโอไซค์ที่ย้อมด้วย Lectin ECL ที่ติดฉลากด้วย Fluorescein Avidin D	61
29	โอโอไซค์ที่ย้อมด้วย Lectin ECL ที่ติดฉลากด้วย Rhodamine Avidin D	62
30	โอโอไซค์ที่ย้อมด้วย Lectin GSL II ที่ติดฉลากด้วย Fluorescein Avidin D	63
31	โอโอไซค์ ที่ย้อมด้วย Lectin GSL II ที่ติดฉลากด้วย Rhodamine Avidin D	64
32	โอโอไซค์ ที่ย้อมด้วย Lectin LEL ที่ติดฉลากด้วย Fluorescein Avidin D	65
33	โอโอไซค์ ที่ย้อมด้วย Lectin LEL ที่ติดฉลากด้วย Fluorescein Avidin D	66
34	โอโอไซค์ ที่ย้อมด้วย Lectin VVA ที่ติดฉลากด้วย Fluorescein Avidin D	67
35	โอโอไซค์ ที่ย้อมด้วย Lectin VVL ที่ติดฉลากด้วย Rhodamine Avidin D	68

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ตัวย่อ	คำอธิบาย
H&E	= Hematoxylin and Eosin
COCs	= Cumulus Oocyte Complexes
ZP	= Zona Pellucida
cm	= Centimeter
° C	= Degree celsius
L	= Liter
µg	= Microgram
µl	= microliter
ml	= milliliter
mm	= millimeter
M	= Molar
min	= minute
UV	= ultraviolet
SSV	= Solid surface vitrification
EM	= Electron microscope
OPS	= open pulled straw
CLV	= cryoloop vitrification
LH	= Lutinizng hormone
GnRH	= gonadotropin releasing hormone
FSH	= Follicle stimulating hormone
EG	= Ethylene glycol
PI	= Popidium iodide

ผลของการเก็บรักษาโอโอไซต์ของสุนัขภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดเยือกแข็งที่มีต่อ  
ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ cumulus-oocyte complexes

**Effect of Cryopreservation of Canine Oocyte on Histological characteristics of the  
Cumulus-oocyte complexes**

คำนำ

ในปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีทางชีวภาพเข้ามาใช้แก้ปัญหาในเรื่องระบบสืบพันธุ์ในสัตว์  
ในด้านการเก็บรักษาพันธุกรรมของสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ หรือสัตว์ที่ใกล้จะสูญพันธุ์  
ได้แก่การทำธนาคารเอ็มบริโอ (embryo banking) ธนาคารอสุจิ (sperm bank) ธนาคารโอโอไซต์  
(oocyte bank) ทำให้สามารถเก็บและขนส่งเอ็มบริโอ อสุจิ และโอโอไซต์จากที่แห่งหนึ่งไปยังอีก  
แห่งหนึ่งได้ และยังมีประโยชน์เชิงพาณิชย์ในรูปเอ็มบริโอ อสุจิ และ โอโอไซต์แช่แข็ง ซึ่งนำไปสู่  
การปรับปรุงพันธุกรรมและเพาะพันธุ์สัตว์ให้ดียิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อตรวจสอบโครงสร้างของโอโอไซต์ที่แยกได้จากรังไข่ในรูป  
ของ cumulus-oocyte complex ภายหลังการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดเยือกแข็งด้วยวิธี  
วิทริฟิเคชัน (Vitrification) เพื่อนำมาทำการปรับปรุงวิธีการในการเก็บรักษาให้มีประสิทธิภาพดี  
ยิ่งขึ้น ปัจจุบันได้มีการนำวิธีวิทริฟิเคชันมาใช้ในการเก็บรักษาโอโอไซต์ของสัตว์เลี้ยงหลายชนิด  
เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถใช้อุปกรณ์ได้หลากหลายได้แก่ electron microscope (EM) grid, open  
pulled straw (OPS), cryoloop และ solid surface vitrification

ปัญหาสำคัญของการใช้วิธีวิทริฟิเคชันเพื่อการเก็บรักษาโอโอไซต์คือการได้อัตรการรอด  
ชีวิตต่ำและโครงสร้างของโอโอไซต์ถูกทำลาย ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราความสำเร็จในการเก็บรักษาโอ  
โอไซต์โดยวิธีวิทริฟิเคชัน ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็ง อัตราการลด  
อุณหภูมิอย่างรวดเร็ว อุปกรณ์ที่ใช้ในการลดอุณหภูมิ ดังนั้นความเสียหายที่เกิดขึ้นแก่โครงสร้าง  
ของโอโอไซต์จึงเป็นตัวชี้วัดคุณภาพของโอโอไซต์ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ทำเพื่อเป็นการ  
ตรวจสอบถึงโครงสร้างของโอโอไซต์ เพื่อนำไปปรับปรุงแก้ไขให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นสำหรับ  
วิธีการเก็บรักษาโอโอไซต์ต่อไปได้

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ cumulus-oocyte complexes ของสุนัขภายหลังการเก็บรักษาโอโอไซต์ภายใต้อุณหภูมิต่ำด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน (vitrification)

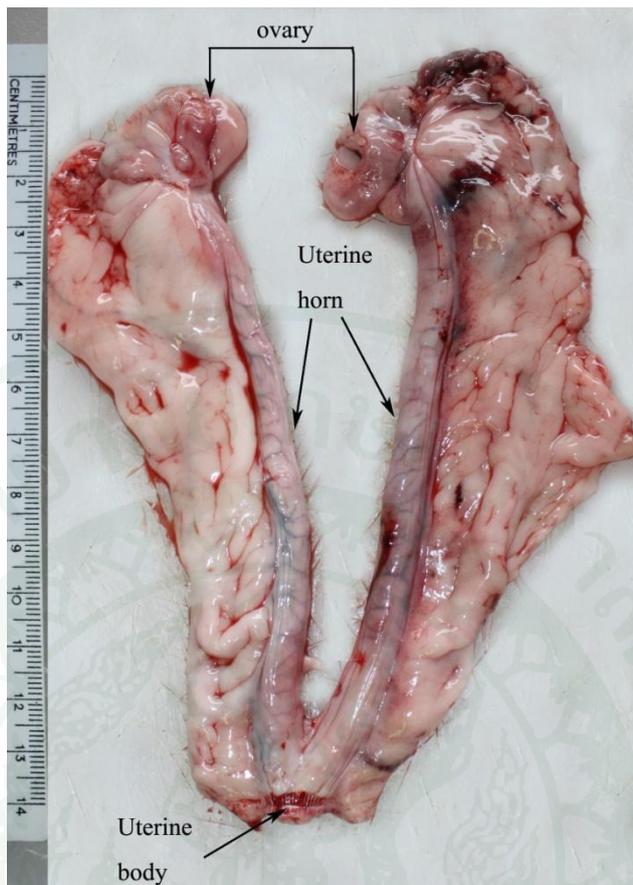


## การตรวจเอกสาร

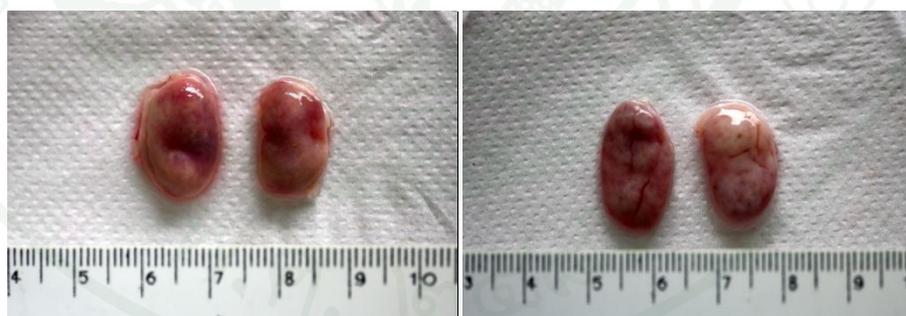
### กายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ของสุนัขเพศเมีย

กายวิภาคของระบบสืบพันธุ์เพศเมียในสุนัขประกอบด้วย รังไข่ (ovary) 2 ข้าง รูปร่างของรังไข่มีลักษณะรีแบน ขนาดกว้างประมาณ 2 เซนติเมตร อยู่ภายใน ovarian bursa รังไข่ในตัวอ่อนมีหน้าที่ผลิตไข่ (oocyte) ซึ่งมีประมาณ 7 แสนฟอง เมื่อสุนัขเข้าสู่ระยะโตเต็มที่จำนวนไข่จะลดลงเหลือประมาณ 2 แสน 5 หมื่นฟอง ในสุนัขอายุ 5 ปี จำนวนไข่จะลดลงเหลือประมาณ 3 หมื่นฟอง เมื่ออายุ 10 ปี จะลดลงเหลือประมาณไม่กี่ร้อยฟอง (เกษกนก, 2548; Cupps, 1987)

รังไข่แต่ละข้างจะต่อกับท่อนำไข่ (oviduct หรือ fallopian หรือ uterine tubes) ซึ่งเป็นท่อยาวประมาณ 4-7 เซนติเมตร กว้าง 1-3 มิลลิเมตร อีกด้านหนึ่งของท่อนำไข่จะต่อกับปีกมดลูก ปีกมดลูกมีลักษณะเป็นท่อยาวประมาณ 4-10 เซนติเมตร และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 เซนติเมตร เพราะเป็นที่ฝังตัวและเจริญเติบโตของตัวอ่อน ขนาดของปีกมดลูกแตกต่างกันไปในสุนัขแต่ละตัวและแต่ละช่วงอายุ จำนวนครั้งของการตั้งท้อง และช่วงระยะเวลาของการเป็นสัด และขนาดเล็กลงเมื่ออยู่ในระยะที่ไม่ได้เป็นสัด ปีกมดลูกทั้งสองข้างจะต่อกับตัวมดลูก (body of uterus) ตัวมดลูกมีขนาดค่อนข้างสั้นและต่อกับปากมดลูก (Cervix) มีลักษณะเป็นท่อ ปากมดลูกจะอยู่ระหว่างตัวมดลูก (body of uterus) กับช่องคลอด (Vagina) ซึ่งมีลักษณะเป็นท่อยาว ผนังบางมีลักษณะเป็นหีบ (Fold) ส่วนปลายของช่องคลอดจะต่อกับช่องเปิดของอวัยวะเพศภายนอก (Vestibule และ Vulva) (เกษกนก, 2548; Concannon, 1991) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างทางกายวิภาคศาสตร์ของมดลูกสุนัขเทศเมีย



ภาพที่ 2 ภาพแสดงรังไข่ของสุนัขในระยาะโปรเฟส

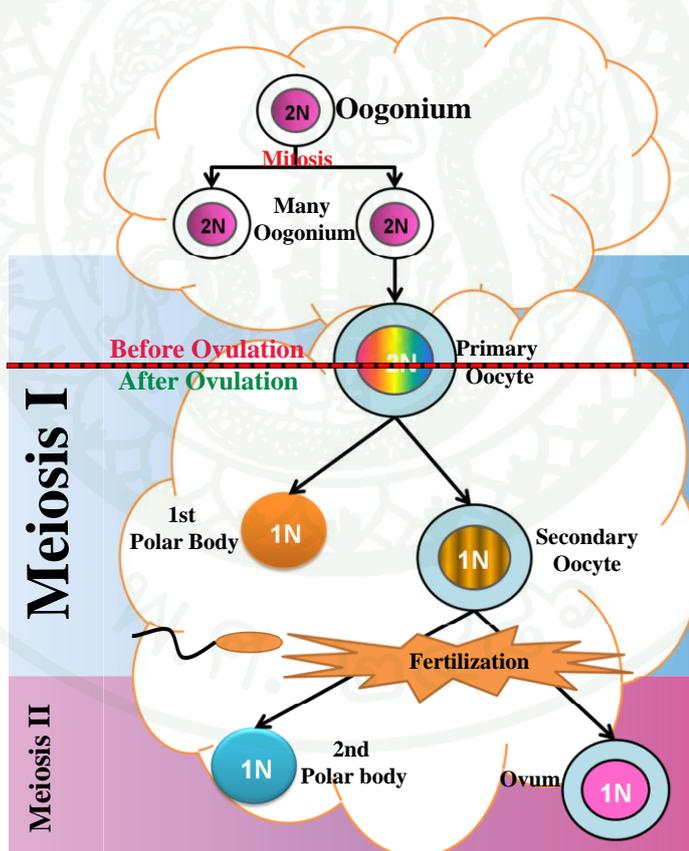
## การเจริญของโอโอไซท์ (Oogenesis)

การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของโอโอไซท์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะเกิดขึ้นในช่วงที่ยังเป็นฟัตัส และจะหยุดการแบ่งเซลล์ครั้งแรกภายหลังคลอดที่ระยะโปรเฟสวัน เรียกว่า first meiotic arrest หรือ ระยะพักที่ 1 หลังจากนั้นจะเริ่มมีการแบ่งเซลล์อีกครั้งก่อนหน้าที่มีการตกไข่ โดยอาศัยอิทธิพลของฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน และเมื่อโอโอไซท์เจริญถึงระยะเมทาเฟสและเกิดการตกไข่ โอโอไซท์จะเข้าสู่ระยะหยุดการแบ่งเซลล์ครั้งที่สอง เรียกว่า second meiotic arrest

โอโอไซท์ของสุนัขแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ โอโอไซท์ที่เกิดจากการตกไข่เป็น primary oocyte ซึ่งการตกไข่เกิดที่ประมาณ 24-72 ชั่วโมงภายหลังมีระดับฮอร์โมน luteinizing hormone (LH) ในกระแสเลือดสูงสุด (LH peak) primary oocyte ใช้เวลาประมาณ 48-72 ชั่วโมง ในการเจริญเป็น secondary oocyte ซึ่งเป็นระยะที่พร้อมจะผสมกับตัวอสุจิ ซึ่งนานกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นถึง 12-36 ชั่วโมง ในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายสุนัข โอโอไซท์ที่เก็บได้จากรังไข่จะเป็นชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ ซึ่งเป็น primary oocyte โดยโอโอไซท์เหล่านี้ต้องใช้เวลาการเพาะเลี้ยงนาน 48-72 ชั่วโมงในการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ (*In vitro* maturation) เช่นเดียวกับโอโอไซท์ที่โตในฟอลลิเคิลขณะอยู่ที่รังไข่ ซึ่งจะพบจำนวนโอโอไซท์โดยเฉลี่ย 15-20 เพอร์เซ็นต์เท่านั้นที่จะเจริญถึงขั้นปฏิสนธิ หรือ เมทาเฟส ทำให้ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงความสำเร็จของลูกสุนัขที่เกิดจากตัวอ่อนที่ผลิตขึ้นในห้องปฏิบัติการ

การพัฒนาของเซลล์ไข่ในตัวอ่อนเริ่มจาก primordial germ cell (PGC) เคลื่อนที่จากผนังของ yolk sac มายังบริเวณที่จะเจริญเป็นรังไข่ ต่อจากนั้น PGC จะมีการแบ่งเซลล์แบบ mitosis เพื่อเพิ่มจำนวนขึ้นพร้อมกับเปลี่ยนแปลงไปเป็น oogonia oogonia บางส่วนพัฒนาไปเป็น primary oocyte ที่มีขนาดของเซลล์ใหญ่ขึ้น และ oogonia บางส่วนที่เหลือยังคงแบ่งเซลล์แบบ mitosis เพิ่มจำนวนต่อไปเรื่อยๆ และจะมีการสลายไปและจะเหลือเพียงเซลล์บริเวณผิวๆ ของรังไข่เท่านั้น ต่อมาเกิดการสร้าง ovarian follicle เกิดจากการที่ epithelium ที่เรียกว่า follicular cell (granulose cell) เข้ามาล้อมรอบ primary oocyte สร้างเป็น primordial follicle ซึ่งประกอบด้วย follicular cell รูปร่างแบน (squamous cell) ล้อมรอบ primary oocyte

primary oocyte ทุกเซลล์ที่เหลืออยู่จะเข้าสู่ระยะ โพรเฟสของ meiosis I ทันที แต่ยังคงค้างอยู่ในระยะ diplotene ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายของโพรเฟสก่อนเข้าสู่เมทาเฟส โดยพักค้างอยู่ในระยะนี้ต่อไปจนถึงเมื่อสัตว์เข้าสู่ระยะโตเต็มวัย ในรังไข่ของสุนัขเพศเมียแรกเกิดจึงประกอบด้วย primary oocyte ซึ่ง อยู่ในระยะ diplotene ของโพรเฟส วัน เชื่อว่า follicular cell สร้างสาร oocyte maturation inhibitor (OMI) มายับยั้งการเจริญของ primary oocyte ไว้ เมื่อถึงระยะวัยเจริญพันธุ์ primary oocyte ในระยะ diplotene ที่จะพร้อมเข้าสู่การเจริญเต็มขั้นเมื่อตกไข่ จะเกิดการแบ่งเซลล์ต่อไปโดยเข้าสู่ระยะเมทาเฟสไปจนเสร็จสิ้น meiosis I ได้เป็น secondary oocyte กับ first polar body เมื่อมีอสุจิเข้ามาปฏิสนธิ จากนั้น secondary oocyte แบ่งเซลล์ต่อไปจนสิ้นสุดระยะ meiosis II ได้เป็น mature oocyte กับ second polar body การพัฒนาของโอโอไซต์จาก primary oocyte จนถึงขั้นที่สามารถเกิดการปฏิสนธิได้นี้ใช้เวลาอย่างน้อย 4 วัน หลังการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของฮอร์โมน LH (Songsasen and Wildt, 2007) (ภาพที่ 3)

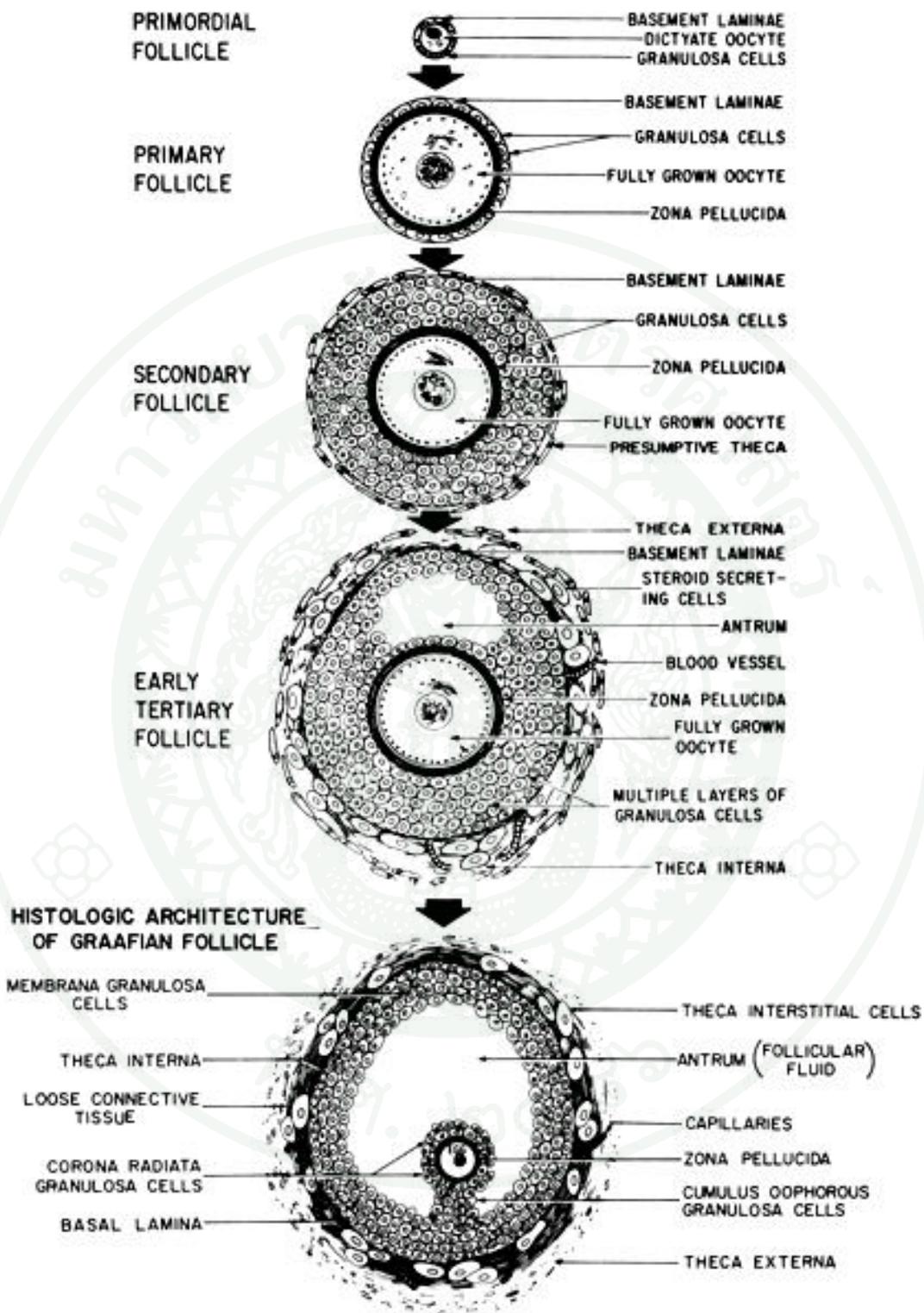


ภาพที่ 3 กระบวนการเจริญของโอโอไซต์ (Oogenesis) ในสุนัข

## การพัฒนาของฟอลลิเคิล (Ovarian folliculogenesis)

การเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลสามารถพบได้ครั้งแรกในรังไข่ของตัวอ่อนสุนัขอายุ 42 วัน ฟอลลิเคิลของสุนัขสามารถแบ่งได้เป็น 5 ระยะ ตามขนาด รูปร่าง ชั้นและลักษณะของ follicular cell และปริมาณ liquor folliculi (Songsasen and Wildt, 2007)

primordial follicle มีขนาดประมาณ 0.04-0.05 มิลลิเมตร ประกอบด้วย primary oocyte หุ้มด้วย follicular cell ที่มีลักษณะแบน เป็น simple squamous epithelium ล้อมรอบเพียงชั้นเดียว primary oocyte มีรูปร่างกลมไม่มี zona pellucida ฟอลลิเคิลระยะนี้จะคงอยู่จนกระทั่งสัตว์เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ เมื่อสัตว์เข้าสู่ในระยะโปรเอสตรัสมีการผลิตฮอร์โมน follicle stimulating hormone (FSH) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า ทำให้ primordial follicle พัฒนาไปเป็น primary follicle มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.05-0.08 มิลลิเมตร มีลักษณะที่ประกอบด้วย follicular cell ซึ่งเป็นเซลล์รูปลูกบาศก์เพียงชั้นเดียว (simple cuboidal ) ล้อมรอบ primary oocyte ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 25 ไมโครเมตร และเมื่อ follicular cell เพิ่มจำนวนโดยการแบ่งตัวแบบ mitosis เพิ่มล้อมรอบ primary oocyte หลายชั้น primary follicle จะพัฒนาไปเป็น secondary follicle ที่มีลักษณะของฟอลลิเคิลขนาดใหญ่กว่าเดิมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.148-0.211 มิลลิเมตร follicular cell มีขนาดใหญ่ขึ้นและมีจำนวนมากขึ้น มีการสร้างสารพวกไกลโคโปรตีนเรียกว่า ZP มาล้อมรอบเยื่อหุ้มเซลล์ของโอโอไซต์ และมีการสร้าง follicular fluid (liquor folliculi) ออกมาอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ซึ่งในที่สุดจะรวมกันเป็นช่องขนาดใหญ่เรียกว่า antrum ในการพัฒนาของฟอลลิเคิลระยะนี้ ยังพบว่าโอโอไซต์เจริญมากขึ้นโดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ  $78 \pm 15$  ไมโครเมตร secondary follicle พัฒนาไปเป็น tertiary follicle ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.35-0.36 มิลลิเมตร มีลักษณะสำคัญคือ จะมีช่องน้ำ antrum ขนาดใหญ่ซึ่งจะดันโอโอไซต์ไปอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของฟอลลิเคิลและช่องน้ำถูกล้อมรอบด้วยชั้นของ granulosa cell เรียกว่า membrane granulosa โอโอไซต์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 100 ไมโครเมตร ถูกล้อมรอบด้วยชั้นของ granulosa cell เรียกว่า cumulus oophorus ชั้นของ granulosa cell ที่ชิดกับ zona pellucida เรียกว่า corona radiata ระยะฟอลลิเคิลเจริญเต็มที่เรียกว่า graafian follicle (mature follicle) เป็นฟอลลิเคิลมีขนาดใหญ่ขึ้นมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 2-13 มิลลิเมตร อยู่บริเวณผิวรังไข่ ช่องว่างที่อยู่ภายในฟอลลิเคิลมีขนาดใหญ่ขึ้น ดังภาพที่ 4 (Songsasen and Wildt, 2007)



ภาพที่ 4 การพัฒนาของฟอลลิเคิล

ที่มา: Bopp and Seifer.(2008)

## การตกไข่และกระบวนการควบคุมการตกไข่

วงรอบการเป็นสัดของสุนัข (Estrous cycle)

สุนัขเพศเมียเริ่มสมบูรณ์พันธุ์เมื่ออายุอยู่ในช่วงประมาณ 8-24 เดือนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสุนัข จะแสดงอาการเป็นสัดปีละ 2 ครั้ง หรือประมาณ 6 เดือนต่อครั้ง วงรอบการเป็นสัดในสุนัขถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนที่ผลิตจากสมองส่วนไฮโปทาลามัส (hypothalamus) และต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland)

วงรอบการเป็นสัดในสุนัขจะแบ่งออกเป็น 4 ระยะดังนี้

ระยะที่ 1 ระยะก่อนช่วงการยอมรับการผสม (Proestrus)

ระยะโปรเอสตรัส เป็นระยะที่มีการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ ระยะนี้กินเวลา 6-11 วัน เฉลี่ยประมาณ 9 วัน ระยะนี้เริ่มจากการที่ฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotropin releasing hormone, GnRH) หลั่งจากไฮโปทาลามัส GnRH ถูกหลั่งออกมาในลักษณะเป็นจังหวะค่อนข้างถี่ (pulse frequency) และจะถูกส่งไปยังต่อมใต้สมองส่วนหน้าและกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองส่วนหน้าหลั่ง FSH FSH จะมีผลทำให้มีการเจริญของฟอลลิเคิล และกระตุ้นให้ granulosa cell ผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจนออกมา ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนมีบทบาททำให้มีการเปลี่ยนแปลงขนาดของอวัยวะเพศและที่ผนังมดลูก ทำให้สุนัขแสดงอาการเป็นสัด โดยพบอวัยวะเพศบวมแดงขยายใหญ่ มีสิ่งคัดหลั่งจากช่องคลอดปนเลือด (sanguineous vaginal discharge) ระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดจะอยู่ในช่วงประมาณ 24-44 พิโคกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้นระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงระดับสูงสุดในช่วง 1-2 วัน สตรีโมนนี้อาจสูงถึง 60-70 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนหมดระยะโปรเอสตรัส

หลังจากผ่านครึ่งแรกของระยะโปรเอสตรัสไปแล้ว ก่อนที่จะเกิดการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของฮอร์โมน LH พบว่าฟอลลิเคิลที่กำลังเจริญเติบโตเกิด luteinization ไปบางส่วน ดังนั้นในช่วงเริ่มแรกของการเป็นสัดจะพบระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงขึ้น

## ระยะที่ 2 ระยะที่ยอมรับการผสม (Estrus)

ระยะเอสตรัส เป็นระยะที่สุนัขเพศเมียแสดงพฤติกรรมตอบสนองต่อเพศตรงข้าม ระยะเอสตรัสในสุนัขมีระยะเวลา 9 วัน มีการเจริญของฟอลลิเคิลสมบูรณ์แล้ว ฮอร์โมนเอสโตรเจนที่เพิ่มสูงขึ้นจะไปส่งผลย้อนกลับ (positive feedback) ทำให้สมองส่วนไฮโปทาลามัสหลั่งฮอร์โมน GnRH ออกมาและไปมีผลต่อต่อมใต้สมองส่วนหน้าให้หลั่ง FSH และ LH ออกมาพฤติกรรมของสุนัขในระยะเอสตรัส เกิดจากการลดลงของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจน และการเพิ่มขึ้นของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงระดับของฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้เกิดในช่วงเริ่มต้นของระยะเอสตรัส เป็นเวลา 1-2 วัน เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนอย่างรวดเร็วจะทำให้ระดับฮอร์โมน LH เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงสุดท้ายของระยะโปรเอสตรัส ก่อนเข้าสู่ระยะเอสตรัส จนถึงเพิ่มสูงสุดที่ระดับ 7-50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรก่อนการเป็นสัด 1 วัน เมื่อระดับฮอร์โมน LH เพิ่มขึ้นที่ระดับสูงสุด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะกระตุ้นให้มีการตกไข่ (Kustritz, 2001) ไข่ที่ตกออกมาอยู่ในระยะ primary oocyte ในช่วงก่อนการตกไข่จะอยู่ในช่วง 180-749 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะทำให้เกิดการสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนขึ้นในช่วง 1-3 วันแรกคงอยู่ในระดับต่ำ (น้อยกว่า 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ในช่วงสุดท้ายของระยะโปรเอสตรัส กำลังเข้าสู่ระยะเอสตรัส ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นเป็น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เพิ่มขึ้นมานี้เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของ granulosa cell ที่ผนังฟอลลิเคิลไปเป็น luteal cell เมื่อถึงช่วงของการตกไข่ ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเพิ่มขึ้นเป็น 3-8 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ภายหลังจากการตกไข่ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะขึ้นสู่ระดับสูงสุดที่ประมาณ 15-18 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

## ระยะที่ 3 ระยะภายหลังการยอมรับการผสม (Diestrus)

ระยะไดเอสตรัส เป็นระยะที่มีการเจริญของ corpus luteum ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิดคือ large luteal cell พัฒนาจาก granulosa cell ในชั้น membrane granulosa และ small luteal cell พัฒนาจาก theca interna (สมชัย, 2425) ทั้งหมดนี้เกิดขึ้นภายหลังการตกไข่ประมาณ 6 วัน ระยะนี้สุนัขจะไม่ยอมรับการผสมจากสุนัขเพศผู้ อวัยวะเพศภายนอกมีลักษณะปกติไม่พบอาการบวมแดง ไม่มีสิ่งคัดหลั่งออกมาจากช่องคลอด ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดจะค่อยๆเพิ่มสูงขึ้น ระยะไดเอสตรัสคงอยู่เป็นเวลา 1-2 เดือนในสุนัขที่ไม่ตั้งท้อง ภายหลังจากการตกไข่ luteal cell จะผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่จะช่วยควบคุมการตั้งท้องในกรณีที่ตั้งตัวผสมติด โดยที่ระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดอยู่ที่ประมาณ 15-18 นาโนกรัม/มิลลิเมตร ตลอด

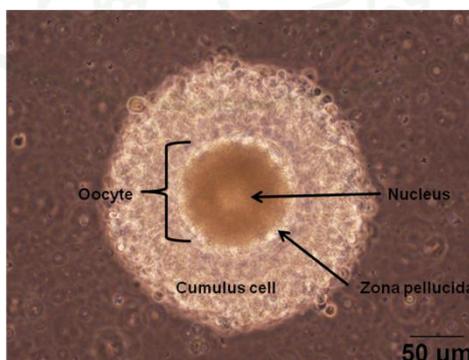
ระยะเวลาการตั้งท้องจนถึงช่วงใกล้คลอด สำหรับสุนัขมีลักษณะพิเศษคือ สุนัขจะตั้งท้องหรือไม่ก็ ตามระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะสูงตลอดในช่วงระยะไดเอสตรัส (เกษกนก, 2548; Concannon, 1991 )

#### ระยะที่ 4 ระยะพัก (Anestrus)

ระยะแอนเอสตรัส เป็นช่วงเวลาที่ corpus luteum สลายเป็นระยะที่เริ่มการพัฒนาของฟอลลิเคิลชุดใหม่ ช่วงท้ายของระยะนี้จะเริ่มพบฮอร์โมน FSH ในกระแสเลือดโดยอยู่ในระดับพื้นฐานเฉลี่ยประมาณ 240-296 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนระดับฮอร์โมน LH ในกระแสเลือด จะอยู่ในช่วงประมาณ 21-156 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนก่อนเข้าสู่ระยะโปรเอสตรัส มีค่าระหว่าง 8-9 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ระยะพักจะกินเวลาสั้นหรือยาวนานอยู่กับเฉพาะตัวของสุนัขนั้นๆ หรือขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ โดยเฉลี่ยจะกินเวลาประมาณ 4-5 เดือน (เกษกนก, 2548; พีรศักดิ์, 2549; Concannon, 1991)

#### โครงสร้างของ cumulus-oocyte complexes (COCs)

เมื่อไข่ตกลงสู่ท่อไข่ ไข่ที่พบมีลักษณะเป็น Cumulus-oocyte complexes ซึ่งประกอบด้วยโอโอไซต์ ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่า 100 ไมโครเมตร และมีนิวเคลียสอยู่บริเวณกลางเซลล์ ภายในไซโทพลาสซึมมองเห็นลักษณะของ lipid yolk droplets ที่มองเห็นเป็นสีดำ และบริเวณรอบโอโอไซต์พบว่ามี zona pellucida ล้อมรอบเห็นเป็นลักษณะวาวใสมีขนาดหนาประมาณ 6-10 ไมโครเมตร และถูกล้อมรอบด้วย cumulus cell ที่มีมากกว่า 2 ชั้นขึ้นไป ดังภาพที่ 5 (Haenisch-Woehl *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2009)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของ Cumulus-oocyte complexes

## Zona pellucid

Zona pellucida เป็นเยื่อไกลโคโปรตีนที่หุ้มโอโอไซต์ช่วงที่กำลังเจริญ และในระยะตกไข่ (ovulated oocyte) รวมทั้งตัวอ่อนในระยะแรก (early embryo) (Yanagimachi, 1994) โครงสร้างนี้มีความสำคัญในการปฏิสนธิและช่วยป้องกันโอโอไซต์และตัวอ่อนในระยะแรก (Wassarman *et al.*, 1999) Zona pellucida ประกอบด้วยเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ชั้นนอกมีลักษณะเป็นร่างแหคล้ายฟองน้ำ (fenestrated sponglike structure) ชั้นในมีลักษณะเป็นเม็ดละเอียด (fine granular appearance) (Yanagimachi, 1994) Zona pellucida ถูกสังเคราะห์จาก granulosa cells จากกระบวนการสร้างฟอลลิเคิลอย่างชัดเจนในระยะ secondary follicle (Songsasen and Wildt, 2007)

จากการศึกษาในหนูเมาส์ zona pellucida ประกอบด้วยไกลโคโปรตีน 3 ชนิด คือ ZP1, ZP2 และ ZP3 ซึ่งโครงสร้างเหล่านี้พบได้ในโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิ โปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้จะมีหน้าที่แตกต่างกันไป ZP3 จะเป็น receptor หลักที่จับกับ SED-1 บนส่วนหัวของอสุจิ และสร้างสัญญาณที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาอะโครโซม (Kupker *et al.*, 1998) นอกจากนี้หมู่น้ำตาลบน ZP3 ยังจับกับ beta-1 galactosyltransferase บนผิวของอะโครโซม ZP2 เป็น receptor ตัวที่สองที่จับกับอสุจิ เพื่อให้การจับกันระหว่างไข่และอสุจิมั่นคงขึ้น ZP1 มีบทบาทในการควบคุมการจับกับอสุจิโดยทำหน้าที่ร่วมกับ ZP2 (Jovine *et al.*, 2005)

จากการศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ Zona pellucida ในรังไข่ของสุนัขด้วย Lectin histochemistry พบมีหมู่น้ำตาลของกลุ่ม  $\beta$ -D-galactose (1,4)N-acetylgalactosamine ( $\beta$ -gal(1,4)glcNac) และ  $\beta$ -D-galactose (1,3)N-acetylgalactosamine ( $\beta$ -gal(1,3)GalNac) อยู่บนผิวของ Zona pellucida จากการจับของ Lectin ในกลุ่ม Succinylated-wheat germ agglutinin (s-WGA), Lycopersicon esculentum lectin (LEL), Solanum tuberosum lectin (STL), Griffonia simplicifolia lectin-II (GSL-II) และ Erythrina cristagalli lectin (ECL) (Blackmore *et al.*, 2004) การมีหมู่น้ำตาลเหล่านี้บนโมเลกุลของ ZP มีความสัมพันธ์ต่อการทำหน้าที่ของ ZP protein โดยหมู่น้ำตาลจะมีหน้าที่เป็น receptor จากการศึกษีโอโอไซต์ของหนูพบว่า O-linked oligosaccharides ที่พบบน ZP3 จะทำหน้าที่จับกับ ZP3 receptor บนอะโครโซม ทำให้เกิดการจับกันขั้นต้นของโอโอไซต์กับอสุจิ ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาอะโครโซม (acrosomal reaction) ขึ้น (Wassarman *et al.*, 2001) กลุ่มของน้ำตาลเกาะอยู่ที่ปลายของสาย oligosaccharides เช่น GalNAc และ  $\alpha$ - and  $\beta$ -Gal จะเป็นตัวที่ทำให้เกิดความจำเพาะในการจับกันระหว่างโอโอไซต์กับอสุจิในแต่ละสปีชีส์ (Parillo *et al.*, 2000) ดังนั้นหมู่น้ำตาลที่พบใน ZP ของสัตว์แต่ละชนิดจึงมีความแตกต่างกัน ในหนูเมาส์พบ  $\alpha$ -

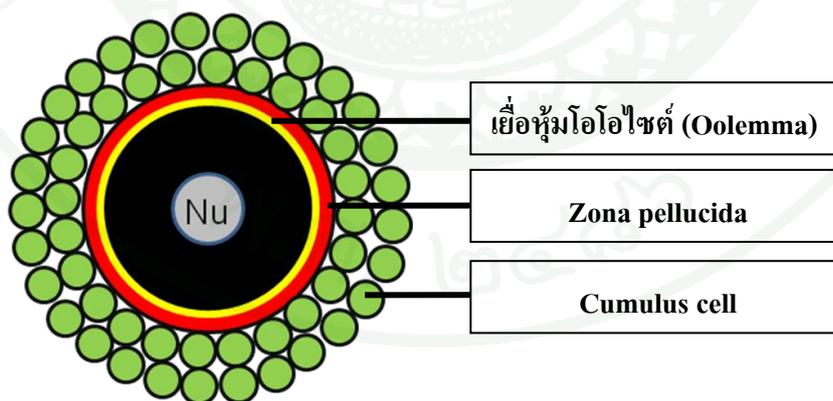
galactosyl (Dean, 2002) ในหมู่แรทพบ L-fucose, D-mannose และ methyl-mannoside (Shalgi *et al.*, 1986) และในสุนัขพบ  $\beta$ -Gal (1,4)glcNac และ  $\beta$ -Gal (1,3)galNac (Blackmore *et al.*, 2004) ZP มีหน้าที่ที่สำคัญหลายอย่างแก่ออโอไซต์ เป็นสิ่งที่เหนี่ยวนำทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณให้กับอสุจิเข้ามา ในการเกิดกระบวนการปฏิสนธิ ป้องกันการเกิด polyspermy และยังเป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่ป้องกันตัวอ่อน ความเสียหายที่เกิดขึ้นแก่ ZP จึงเป็นตัวชี้วัดคุณภาพของออโอไซต์โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการรับการปฏิสนธิ (Neeta and Suneeta, 2009)

### หม่อน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของ Cumulus-Oocyte complexes ในสุนัข

เยื่อหุ้มออโอไซต์ (Oolemma) ประกอบด้วยหม่อน้ำตาล  $\beta$ -galactose(1,3) N-acetylgalactosamine และ N-acetylgalactosamine

Zona pellucida ประกอบด้วยหม่อน้ำตาล  $\alpha$ -Mannose, N-acetylglucosamine,  $\alpha$ - and  $\beta$ -N-acetylglucosamine,  $\beta$ -D-galactose(1,4) N-acetylgalactosamine,  $\beta$ -galactose(1,3) N-acetylgalactosamine และ N-acetylgalactosamine

Cumulus cell ประกอบด้วยหม่อน้ำตาล  $\alpha$ -Mannose, N-acetylglucosamine,  $\alpha$ - and  $\beta$ -N-acetylglucosamine และ  $\beta$ -D-galactose(1,4) N-acetylgalactosamine (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 หม่อน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของ Cumulus-Oocyte complexes ในสุนัข

## Cumulus cell

Cumulus cell มีบทบาทหน้าที่ตอบสนองต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรปินที่หลั่งออกมาทำให้เกิดผลิต hyaluronic acid ออกมาสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ และรวมตัวกับ glycosaminoglycans ให้เกิดการเสถียรและสามารถต้านทานการย่อยของเอนไซม์ hyaluronidase เรียกกระบวนการเกิดนี้ว่า cumulus expansion (Ball et al., 1992; Mattioli, 1994) กลุ่มเซลล์นี้มีหน้าที่ในการค้ำจุนโอโอไซต์ให้เกิดขบวนการเจริญเติบโต และมีบทบาทในการนำสารอาหารจากภายนอก COCs ไปสู่โอโอไซต์ รวมถึงทำหน้าที่ควบคุม COCs ให้เดินทางไปสู่ท่อหน้าไข่ โดยจะมีการสร้างสาร extracellular cumulus matrix ออกมาเพื่อลดแรงเสียดทานระหว่าง COCs กับ cilia ของท่อหน้าไข่ทำให้ COCs เข้าไปสู่ท่อหน้าไข่ได้เร็วขึ้น (Mahi-Brown and Yanagimachi, 1933; Lam et al., 2000) นอกจากนี้ cumulus cell ยังมีส่วนสำคัญในการพัฒนาของ โอโอไซต์โดยกระตุ้นขบวนการแบ่งเซลล์แบบ meiosis และ cytoplasmic maturation (Hurt et al., 2000) cumulus cell มีบทบาทในการปฏิสนธิ คือ จะมีการหลั่งสารออกมาเพื่อส่งสัญญาณดึงดูดอสุจิให้เข้ามาล้อมรอบ COCs และสร้างสภาวะแวดล้อมเพื่อช่วยทำให้เกิด sperm capacitation, acrosome reaction และ penetration (Tesarik, 1996)

cumulus cell สื่อสารกันระหว่างแต่ละเซลล์และโอโอไซต์โดยผ่านทาง gap junction gap junction พบที่บริเวณส่วนที่ติดกับ oolemma โดยทะลุผ่าน ZP gap junction นี้เป็นช่องทางที่ใช้สำหรับเป็นที่ส่งผ่าน ions และ สารที่มีโมเลกุลเล็กระหว่างเซลล์ (Moor et al., 1980; Eppig, 1992; Furger et al., 1996)

## การเก็บรักษาโอโอไซต์โดยการแช่แข็ง (Oocyte cryopreservation)

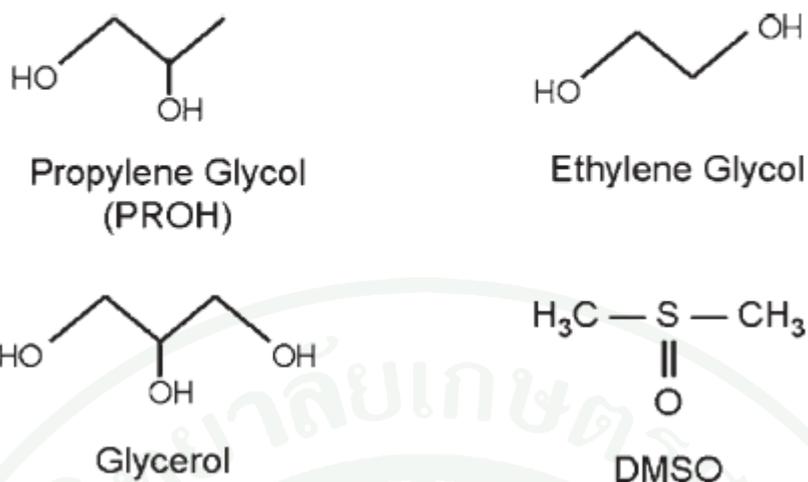
การเก็บรักษาโอโอไซต์โดยการแช่แข็งเป็นการเก็บรักษาโอโอไซต์ภายใต้สภาพอุณหภูมิต่ำ -196°C ในไนโตรเจนเหลว โดยยังคงความมีชีวิตของเซลล์ไว้ (Jain and Paulson, 2006) การแช่แข็งโอโอไซต์มีความสำคัญต่อการเก็บรักษาโอโอไซต์ของสัตว์ที่มีพันธุกรรมดี ช่วยอนุรักษ์พันธุกรรมของสัตว์ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ และมีประโยชน์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของมนุษย์ และสัตว์ต่อไป

ข้อดีของการแช่แข็งเซลล์สืบพันธุ์จะทำให้เซลล์คงยังมีชีวิตรอดได้นานถึงหลายร้อย หรือหลายพันปีได้ (Mazur, 1980) ข้อเสียของการแช่แข็งเซลล์สืบพันธุ์ คืออาจส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ได้ จากการศึกษาการแช่แข็งโอโอไซต์ในมนุษย์ พบว่าโอโอไซต์จะมีชีวิตรอด และเกิดกระบวนการทำงานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่จะไม่มีกิจกรรมทางชีวภาพที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ในการแช่แข็งเซลล์โดยการลดอุณหภูมิจาก 37 องศาเซลเซียส มาเป็น -196 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในไซโตพลาสซึมซึ่งจะเพิ่มความดันภายในเซลล์ (Jain and Paulson, 2006) ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อ organelle ต่างๆ ได้แก่ โครโมโซม และไมโทติคสปีนเดิล โดยไมโทติคสปีนเดิลจะเปราะส่งผลให้เกิดการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติไปได้ เพราะไม่สามารถเกิดไมโครทิวบูลที่จะนำโครโมโซมให้ไปจับคู่กัน มีผลให้พบตัวอ่อนที่มีโครโมโซมเพียงชุดเดียวหลังการปฏิสนธิ (Neeta and Suneeta, 2009)

#### สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (Cryoprotectant)

ในการแช่แข็งเซลล์ นั้นจะมีการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วทำให้เกิดความเสียหายกับเซลล์ จึงจำเป็นต้อง สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (Cryoprotectant) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีความสามารถในการปกป้องเซลล์ไม่ให้เกิดอันตรายจากผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์

โดยทั่วไปสารนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ สารป้องกันการแช่แข็งชนิดที่ซึมผ่าน (permeating cryoprotectant) และ สารป้องกันการแช่แข็งชนิดไม่ซึมผ่าน (nonpermeating cryoprotectant) (Jain and Paulson, 2006) สารป้องกันการแช่แข็งชนิดที่ซึมผ่านมีโมเลกุลขนาดเล็กที่สามารถซึมผ่านผนังของเซลล์ได้ดี สารกลุ่มนี้มีโครงสร้างทางเคมีที่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลน้ำ ซึ่งทำให้สารกลุ่มนี้สามารถป้องกันการตกผลึกของน้ำแข็งในไซโตพลาสซึมได้เมื่อใช้ที่ความเข้มข้นสูง โครงสร้างทางเคมีทั่วไปของสารป้องกันการแช่แข็งชนิดซึมผ่าน ได้แก่ propylene glycol, ethylene glycol, glycerol และ dimethyl sulfoxide ดังได้แสดงไว้ในภาพที่ 6 (Jain and Paulson, 2006)



ภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างทางเคมีทั่วไปสารกลุ่มสารป้องกันการแช่แข็งชนิดที่ซึมผ่าน

ที่มา: (Jain and Paulson, 2006)

ตารางที่ 1 แสดงโครงสร้างทางกายภาพของ Ethylene glycol (EG)

โครงสร้างทางกายภาพของ Ethylene glycol (EG)	
สูตรโครงสร้างทางเคมี	$C_2H_6O_2$
จุดหลอมเหลว	$-12.9^{\circ}C$
น้ำหนักโมเลกุล	62.07 g/M
ความหนาแน่น	$1.1132 \text{ g/cm}^3$

ที่มา: Jain and Paulson (2006)

สารป้องกันการแช่แข็งชนิดไม่ซึมผ่านที่นิยมคือกลุ่มของ disaccharides ได้แก่ ซูโคส กาแลคโตส กลูโคส และทรีฮาโลส เป็นต้น ส่วนในการแช่แข็ง สารป้องกันการแช่แข็งชนิดที่ไม่ซึมผ่านมีคุณสมบัติที่ไม่สามารถผ่านผนังเซลล์ สารนี้เพิ่มแรงดันออสโมติกของสารละลายรอบๆเซลล์ทำให้น้ำภายในเซลล์แพร่ผ่านออกจากเซลล์ ซึ่งส่งผลให้เกิดภาวะขาดน้ำภายในเซลล์ ดังนั้นเมื่อใช้ร่วมกับสารป้องกันการแช่แข็งชนิดที่ซึมผ่าน สารกลุ่มนี้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็งชนิดซึมผ่านภายในไซโตพลาสซึม

สารป้องกันการแช่แข็งชนิดไม่ซึมผ่านยังมีบทบาทสำคัญต่ออัตราการรอดของเซลล์ไข่ ระหว่างการละลาย โดยน้ำแข็งที่ละลายอย่างรวดเร็วจะช่วยลดแรงดันออสโมติกภายนอกเซลล์ การซึ่อกของเซลล์จากการเกิดแรงดันออสโมติกอาจเกิดขึ้นจากปริมาณน้ำในไซโตพลาสซึมที่เพิ่มขึ้น หากสารป้องกันการแช่แข็งภายในเซลล์ไม่สามารถแพร่ออกไปอย่างรวดเร็วพอทำให้น้ำคั่งภายใน เซลล์ ส่งผลให้เซลล์บวม หรือแตก (Jain and Paulson, 2006)

### การคัดเลือกโอโอไซต์เพื่อการแช่แข็ง

การคัดเลือกโอโอไซต์จากระยะการตกไข่ (ovarious stage) ที่อยู่ในวงจรการเป็นสัด (estrous cycle) ที่มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 100 ไมโครเมตร (Songsasen and Wildt, 2007) มีจำนวนชั้นของ cumulus cell ล้อมรอบตั้งแต่ 2 ชั้นขึ้นไป (Hanna *et al*, 2008)

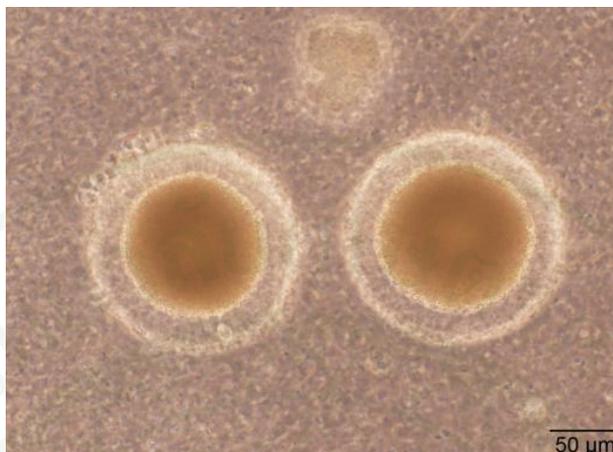
คุณภาพโอโอไซต์แบ่งได้เป็น 5 ประเภทตามที่ Apimeteetumrong (1996) และ Techakumphu และคณะ (2000) ได้รายงานไว้ คือ

1. โอโอไซต์ชนิด Complex cumulus oocyte (CCO) เป็นชนิดที่มี cumulus cell จำนวนหลายชั้นหุ้มล้อมรอบเปลือก zona pellucida (ภาพที่ 8)



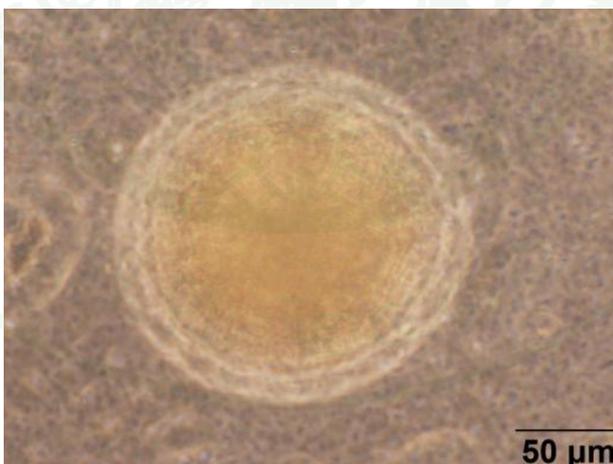
ภาพที่ 8 แสดงลักษณะโอโอไซต์ชนิดที่มี cumulus cell จำนวนหลายชั้นหุ้มล้อมรอบเปลือก zona pellucida

2. โอโอไซตส์ชนิด Partial cumulus oocyte (P) เป็นชนิดที่มี cumulus cell หุ้มหนึ่งถึงสองชั้นรอบเปลือก zona pellucida (ภาพที่ 9)



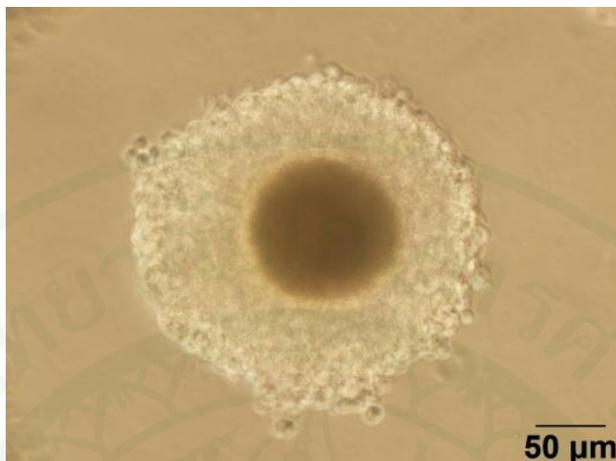
ภาพที่ 9 แสดงลักษณะโอโอไซตส์ชนิด ที่มี cumulus cell หุ้มหนึ่งถึงสองชั้นรอบเปลือก zona pellucida

3. โอโอไซตส์ชนิด Denude oocyte (D) เป็นชนิดที่ไม่มี cumulus cell หุ้มเลยรอบเปลือก zona pellucida (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 แสดงลักษณะโอโอไซตส์ชนิด ไม่มี cumulus cell หุ้มเลยรอบเปลือก zona pellucida

4. โอโอไซตส์ชนิด Expanded cumulus oocyte (EXP) เป็นชนิดที่มี cumulus cell หุ้มกระจายรอบเปลือก zona pellucida (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 แสดงลักษณะโอโอไซตส์ชนิดที่มี cumulus cell หุ้มกระจายรอบเปลือก zona pellucida

5. โอโอไซตส์ชนิด Degenerated oocyte (Deg) เป็นโอโอไซตส์ที่มีไซโตพลาซึมภายในเสื่อมสลาย (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 แสดงลักษณะโอโอไซตส์ชนิดที่มีไซโตพลาซึมภายในเสื่อมสลาย

### วิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ (slow freezing)

การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ (slow freezing) เป็นการลดอุณหภูมิเซลล์ที่อยู่ในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) ที่เสริมด้วยสารป้องกันการแช่แข็ง เช่น dimethylsulfoxide (DMSO) และ glycerol ให้เย็นลงอย่างช้าๆจนอุณหภูมิจาก -7 องศาเซลเซียส จนถึง ต่ำกว่า -80 องศาเซลเซียส แต่ส่วนใหญ่นิยมใช้ glycerol ที่มีความเข้มข้น 1.4 โมลาร์ ในสารละลาย PBS ที่เสริม bovine serum 15 เปอร์เซ็นต์ หรือใช้ bovine serum albumin ที่มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิจากห้องถึง 0 องศาเซลเซียส และชักนำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (seeding) ที่อุณหภูมิจาก -4 ถึง -7 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงลดอุณหภูมิต่อ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 0.3 องศาเซลเซียสต่อ นาที จนถึงช่วง -32 ถึง -35 องศาเซลเซียส จึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที (สหัส, 2548) ในวิธีแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ จึงต้องมีการชักนำให้น้ำยาค่อยๆแข็งตัวที่อุณหภูมิจากประมาณ -5 องศาเซลเซียส ถึง -7 องศาเซลเซียส ซึ่งทำได้โดยใช้แท่งโลหะ หรือปากกิบแช่ไว้ในไนโตรเจนเหลว เมื่อลดอุณหภูมิจากน้ำยาที่มีเซลล์ถึง -5 องศาเซลเซียส ถึง -7 องศาเซลเซียส แล้วก็ใช้ปากกิบนั้นแตะที่ข้างๆหลอดที่บรรจุเซลล์และน้ำยา น้ำยาภายในหลอดนั้นจะค่อยๆ กลายเป็นน้ำแข็งทั้งอัน (อร่าม และ สมพร, 2539) วิธีนี้จะใช้สารป้องกันการแช่แข็งที่ระดับความเข้มข้นต่ำเพื่อไม่ให้เกิดความเป็นพิษกับไอโอไซค์ ขบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์จะลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับทุกๆอุณหภูมิ 10°C ที่ลดลง (Jain *et al.*, 2006)

ข้อดีของวิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้าๆคือ ไอโอไซค์มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิลดอย่างช้าๆ จึงทำให้เซลล์เกิดความเสียหายน้อย และการใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่ระดับความเข้มข้นต่ำ จึงทำโอกาสในการเกิดความเป็นพิษของเซลล์น้อยลง เพราะหลังจากเกิดความสมดุล อุณหภูมิจะค่อยๆ ลดลงไปอุณหภูมิต่ำสุดที่ -32 °C ซึ่งในช่วงเวลานี้มีการสร้างผลึกน้ำแข็ง ร่วมกับสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งชนิดไม่ซึมผ่านที่เพิ่ม osmolality ของน้ำนอกเซลล์จะทำให้ น้ำระบายออกจากเซลล์ มีผลให้ปริมาณน้ำในเซลล์ลดลงและทำให้ความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็งภายในเซลล์เพิ่มขึ้น อัตราการลดลงของอุณหภูมิจากที่ช้ามากช่วยให้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งชนิดซึมผ่านแพร่ผ่านเข้าสู่ไอโอไซค์ ขณะที่เกิดความสมดุลขึ้นทั่วทั้งเซลล์ (Jain and Paulson, 2006)

ข้อเสียของวิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ คือการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆนี้ต้องใช้ อัตราเร็วสม่ำเสมอซึ่งต้องใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิแบบตั้งโปรแกรมซึ่งมีราคาสูง (Jain and Paulson., 2006) นอกจากนี้การทำละลายเซลล์ที่แช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ ต้องใช้ความเร็วต่ำในการเพิ่ม อุณหภูมิเช่นกันเพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้น้ำไหลกลับเข้าเซลล์เร็วจนเกินไปขณะที่เซลล์มีสภาพขาดน้ำ (Gordon, 1994; Hochi *et al.*, 1994; Saito, 1994)

### การแช่แข็งแบบ 2 ขั้นตอน (two- step freezing)

การแช่แข็งแบบสองขั้นตอน มีขั้นตอนการลดอุณหภูมิ 2 ขั้นตอนด้วยกันคือ การลดจากระดับ อุณหภูมิห้องไปยังอุณหภูมิที่ชักนำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (-7 องศาเซลเซียส) ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ - 10 องศาเซลเซียสต่ออนาที ตามด้วยการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจนถึง -30 องศาเซลเซียสก่อนจุ่มลงใน ไนโตรเจนเหลว ส่วนการทำละลายให้จุ่มในน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียส วิธีการนี้เชื่อว่าทำให้เซลล์เกิด ผลึกน้ำแข็ง (intracellular ice) ขึ้นเพื่อเป็นการป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งคืนรูปภายหลังอีกครั้ง (recrystallization) แต่เซลล์ยังสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ (Gordon, 1994; Hochi *et al.*, 1994)

### การแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิด้วยความเร็วสูง (Ultrarapid freezing)

สืบเนื่องมาจากการแช่แข็งแบบมาตรฐานทั่วไปที่ต้องใช้อุปกรณ์มาก และผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญสูง (Gordon, 1994) มีการพัฒนาวิธีการแช่แข็งด้วยความเร็วสูง ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่ายและมี ค่าใช้จ่ายน้อยกว่าวิธีดั้งเดิม โดยใช้สารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นมากขึ้น โดยใช้สารผสม DMSO/glycerol ที่ความเข้มข้น 4.5 โมลาร์ และซูโครสที่ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เมื่อใช้สารป้องกันการ แช่แข็งที่มีความเข้มข้นมากจะต้องแช่สารละลายให้อิ่มตัว (equilibrium) ที่อุณหภูมิ 0 องศา เซลเซียส เพราะอุณหภูมิห้องปกติมีผลทำให้เซลล์ได้รับอันตรายจากความเป็นพิษของสารป้องกันการ แช่แข็ง การแช่แข็งทำให้อุณหภูมิลดลงอย่างรวดเร็ว โดยจุ่มหลอดบรรจุเซลล์ลงในไนโตรเจนเหลว ทันที ซึ่งแตกต่างกับวิธีการแช่แข็งอย่างรวดเร็ว ตรงที่มีการอ้งหลอดบรรจุเซลล์เหนือไอ ไนโตรเจนเหลวก่อนจุ่มหลอดลงไปไนโตรเจนเหลว ส่วนการละลายต้องทำการละลาย 3 หรือ 4 ขั้นตอนโดยนำไอโอไฮด์ที่แช่แข็งผ่านสารละลายที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสจากมากไป น้อย พบว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจ (สหัส, 2548)

### การแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชัน (Vitrification method)

เป็นวิธีที่คัดแปลงมาจากวิธีการแช่แข็งด้วยความเร็วสูง โดยใช้สารป้องกันการแช่แข็งชนิดซึมผ่านเซลล์หลายชนิดที่มีความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 40 โดยมีจุดมุ่งหมายให้สารเหล่านี้เปลี่ยนสภาพเป็นผลึกแก้ว (stable glass) ในสภาพปราศจากผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งเป็นผลจากการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว เมื่อมีการใช้สารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูง จึงต้องใช้ความเร็วสูงในการแช่แข็งและละลาย (Mahmoudzadeh *et al.*, 1993) และต้องผสมน้ำยากับเซลล์ในที่มีอุณหภูมิต่ำประมาณ 0-4 องศาเซลเซียส หลังจากแช่ไอโอไซค์ในสารละลายอิมตัวจะแช่แข็งโดยนำไอโอไซค์สัมผัสโดยตรงกับไนโตรเจนเหลวอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการสร้างผลึกน้ำแข็งในไซโตพลาสซึมที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (Jain and Paulson, 2006)

ข้อดีของการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันคือไม่ต้องใช้เครื่องลดอุณหภูมิแบบตั้งโปรแกรมที่มีราคาสูง และสามารถลดขั้นตอนและเวลาที่ใช้ในการแช่แข็ง (Palasz and Mapletoft, 1996) อีกทั้งยังป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายจากการเกิดผลึกน้ำแข็งได้ ข้อเสียของการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชัน คือสารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงที่ใช้ในวิธีนี้จะเป็นพิษต่อเซลล์มากที่อุณหภูมิห้อง (ดวงใจ, 2551)

### การแช่แข็งไอโอไซค์โดยวิธีการวิทริฟิเคชันในสัตว์เลี้ยงชนิดต่างๆ

การแช่แข็งเซลล์โดยวิธีวิทริฟิเคชันเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการแช่แข็งไอโอไซค์ ได้มีการรายงานความสำเร็จในการใช้วิธีวิทริฟิเคชันในการแช่ไอโอไซค์ของมนุษย์ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1999 โดย Kuleshova และคณะ โดยทำกับไอโอไซค์ จำนวน 17 ใบ โดยใช้ ethylene glycol เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ และ ซูโครสเข้มข้น 0.6 โมลาร์ต่อลิตรใน open pulled straws ต่อมา มีการรายงานผลความสำเร็จของการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันของไอโอไซค์ของมนุษย์จำนวน 474 ใบ โดย Yoon และคณะใน ปี 2003 ไอโอไซค์ที่วางบน electron-microscope grid จะแช่แข็งในสารละลาย ethylene glycol เข้มข้น 5.5 โมลาร์ และ ซูโครสเข้มข้น 0.1 โมลาร์ นักวิจัยได้รายงานอัตราการรอดชีวิตของไอโอไซค์ที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธีนี้ไว้ที่ 68.7 เปอร์เซ็นต์ อัตราการปฏิสนธิของไอโอไซค์อยู่ที่ 71.7 เปอร์เซ็นต์ อัตราการฝังตัวของไอโอไซค์หลังการปฏิสนธิอยู่ที่ 6.4 เปอร์เซ็นต์ และ การตั้งครรภ์ และ อัตราการเกิดต่อการย้ายฝากเท่ากับ 21.4 เปอร์เซ็นต์

การแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันจำเป็นต้องใช้สารป้องกันการแช่แข็งชนิดซึมผ่านที่มีความเข้มข้นสูง (Mukaida et al., 1998) ได้แก่ dimethyl sulfoxide, glycerol, propandiol, ethylene glycol, propylene glycol ดังที่ได้มีการรายงานของ Chian และคณะ ในปี ค.ศ. 2005 ethylene glycol ถูกใช้เป็นสารป้องกันการแช่แข็งร่วมกับ propylene glycol และ ซูโครส เพื่อแช่แข็ง โอโอไซต์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจำนวน 180 ใบ ในภาชนะปิดสนิทที่เรียกว่า cryoleaf พบอัตราการรอดชีวิตของ โอโอไซต์ไว้ที่ 93.9 เปอร์เซ็นต์ อัตราการปฏิสนธิของ โอโอไซต์อยู่ที่ 74.6 เปอร์เซ็นต์ อัตราการฝังตัวของ โอโอไซต์หลังการปฏิสนธิอยู่ที่ 20.4 เปอร์เซ็นต์ และ อัตราการตั้งครรภ์ต่อผู้ป่วยที่ 46.7 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยของจำนวนตัวอ่อนที่มีการย้ายฝากเท่ากับ  $3.6 \pm 1.3$

จากที่ได้กล่าวไว้แล้วว่าการแช่แข็งโดยวิธีวิทริฟิเคชันมีข้อเสีย คือสารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงที่ใช้ในวิธีนี้จะเป็นพิษมากที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นนักวิจัยหลายกลุ่มจึงได้มีการเพิ่มอัตราความเร็วในการแช่แข็งให้สูงขึ้น เพื่อลดความเป็นพิษของสารป้องกันการแช่แข็งที่อุณหภูมิห้อง และป้องกันการถูกทำลายจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง โดยการลดปริมาตรของสารละลายป้องกันการแช่แข็งให้น้อยที่สุด ดังนั้นจึงมีการพัฒนาอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งให้ดียิ่งขึ้น (ตารางที่ 2)

## ตารางที่ 2 แสดงวิธีการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันโดยใช้อุปกรณ์ต่างๆ

วิธีการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันโดยใช้อุปกรณ์ต่างๆ	ผู้ศึกษา
Electron microscope (EM) grid vitrification	Martino และคณะ (1996)
Open pulled straw (OPS) vitrification	Vajta และคณะ (1998)
Cryoloop vitrification (CLV)	Lane และคณะ (1999)
Solid surface vitrification (SSV)	Dinnyes และคณะ (2000)

หลังจากที่มีการพัฒนาอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในวิธีการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งให้ดีขึ้น พบว่าประสิทธิภาพของการแช่แข็งด้วย EM grid และ OPS สามารถเพิ่มอัตราความเร็วในการแช่แข็งได้สูงขึ้น จากอัตราความเร็วในการลดอุณหภูมิในการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันแบบดั้งเดิม (Conventional straw vitrification) ซึ่งใช้หลอดพลาสติก 0.25 มิลลิลิตร (Vajta et al., 1998) cryoloop vitrification (CLV) เป็นวิธีวิทริฟิเคชันอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถลดปริมาตรสารละลายป้องกันการแช่แข็ง วิธีนี้ง่ายต่อการเก็บในไนโตรเจนเหลวและไม่มีปัญหาเซลล์

สูญหาย วิธี CLV ได้ถูกนำมาใช้แช่แข็งเอ็มบริโอและโอโอไซต์ของสัตว์หลายชนิด เช่น หนูเม้าท์ หนูแฮมเตอร์ หนูแรท และ โค (Lane *et al.*, 1999) ต่อมาในปี ค.ศ. 2000 Dinnyes และคณะ (Dinnyes *et al.*, 2000) รายงานความสำเร็จครั้งแรกของการใช้ SSV แช่แข็งโอโอไซต์โค พบว่าวิธีนี้สามารถรักษาสภาพเยื่อหุ้มเซลล์ของโอโอไซต์ได้เป็นอย่างดี และสามารถนำโอโอไซต์ที่ผ่านการแช่แข็งไปใช้ในการทำโคลนนิ่งได้สำเร็จ (Bagis *et al.*, 2005) ในปี ค.ศ. 2003 Begin และคณะ ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี SSV กับ CLV ในการแช่แข็งโอโอไซต์และเอ็มบริโอแกะ พบว่าตัวอย่างการแช่แข็งของทั้งสองวิธีมีอัตราการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกัน โดยอัตราการรอดชีวิตของโอโอไซต์และเอ็มบริโอโดยวิธีการ SSV เท่ากับ 60 และ 39 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอดชีวิตของโอโอไซต์และเอ็มบริโอโดยวิธีการ CLV เท่ากับ 89 และ 88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

### วิธีการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันโดยใช้อุปกรณ์ต่างๆ

#### 1. วิธีการแช่แข็งวิทริฟิเคชัน โดยใช้ Electron-microscope grid (EM grid)

หลักการของวิธีการนี้ คือการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเนื่องจากโลหะนำความร้อนได้ดีกว่าหลอดพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร และยังคงปริมาตรของสารละลายที่มีโอโอไซต์แขวนลอยให้น้อยที่สุด

รายละเอียดของการแช่แข็งโดยวิธีนี้มีดังนี้ วางกลุ่มโอโอไซต์ประมาณ 10-15 ใบ บรรจุในสารละลายที่มีสารป้องกันการแช่แข็งปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร บนแผ่นตะแกรงโลหะ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.05 มิลลิเมตรหนา 0.037 มิลลิเมตร ช่องตะแกรงแต่ละช่องมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 ไมครอน โอโอไซต์จะเกาะติดกับแผ่นโลหะด้วยแรงดึงดูดจากนั้นทำการจุ่มแผ่นตะแกรงลงในโตรเจนเหลวทันทีโดยโอโอไซต์จะไม่หลุดออกจากแผ่นโลหะ (Martino *et al.*, 1996) ในปี ค.ศ. 1999 Kuleshova และคณะ (Kuleshova *et al.*, 1999) ได้มีการทำการทดลองใช้ EM grid แช่แข็งโอโอไซต์ของมนุษย์พบว่าอัตราการรอดชีวิตโอโอไซต์สูงถึง 68.7 เปอร์เซ็นต์ อัตราการปฏิสนธิของโอโอไซต์อยู่ที่ 71.7 เปอร์เซ็นต์ อัตราการฝังตัวหลังการปฏิสนธิ 6.4 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการตั้งครรภ์ และอัตราการเกิดต่อการย้ายฝากเท่ากับ 21.4 เปอร์เซ็นต์

## 2. วิธีการแช่แข็งวีทรีพีเกชั่น โดยใช้ Open-Pulled Straw (OPS)

การแช่แข็งวีทรีพีเกชั่นโดยใช้ OPS เป็นวิธีการที่พยายามให้โอโอไซต์แขวนลอยในน้ำยาที่มีสารป้องกันการแช่แข็งน้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้ รายละเอียดของวิธีนี้ คือ การแช่แข็งในหลอดพลาสติกขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ใช้กันทั่วไปแต่ใช้การดึงให้เส้นผ่านศูนย์กลางและจากความหนาของผนังหลอดลดลงประมาณครึ่งหนึ่งจากเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.7 มิลลิเมตร เป็น 0.8 มิลลิเมตร และความหนาจาก 0.15 มิลลิเมตร เป็น 0.07 มิลลิเมตร แล้วดูดโอโอไซต์เข้าไปด้วยแรงอัดโนมัติเมื่อปลายหลอดสัมผัสกับของเหลวทำให้มีปริมาตรของของเหลวเพียง 2-3 ไมโครลิตร ไม่ต้องปิดปลายหลอดแล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที (Vajta, 1998)

ข้อดีของการใช้ OPS มีหลายประการ ได้แก่ จากการที่ผนังของหลอดบางลงทำให้การเป็นฉนวนความร้อนลดลงและมีปริมาตรของของเหลวที่โอโอไซต์แช่อยู่น้อยเนื่องจากเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเล็กลง โดยตรงทำให้การแลกเปลี่ยนอุณหภูมิเป็นไปได้อย่างรวดเร็วและใช้เวลาในการแช่แข็งน้อย แรงดูดโอโอไซต์อัดโนมัติจากหลอดบรรจุที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กทำให้บรรจุโอโอไซต์ได้รวดเร็วและง่ายขึ้น เปลือก zona pellucida เสียหายน้อยมาก อันเนื่องมาจากการเปิดปลายหลอดไว้ทำให้ไม่เกิดความดันของอากาศที่ข้างอยู่ภายในหลอดดังเช่นที่พบเมื่อมีการปิดหลอดไว้ (ดวงใจ, 2551)

## 3. วิธีการแช่แข็งแบบวีทรีพีเกชั่น โดยใช้ cryoloop (CLV)

วิธีการแช่แข็งแบบวีทรีพีเกชั่น โดยใช้ cryoloop (CLV) เป็นวิธีที่พัฒนามาหลังจากการใช้ OPS เพื่อพยายามให้โอโอไซต์แขวนลอยในน้ำยาที่มีสารป้องกันการแช่แข็งน้อยกว่า ซึ่งส่วนใหญ่นำมาใช้กับเซลล์ที่ไวต่อการแช่แข็งมากๆ มีการรายงานผลของการแช่แข็งโอโอไซต์ของมนุษย์ โดย Kuwayama et al.(2005) ได้รายงานถึงประสิทธิภาพในการทำการแช่แข็งโอโอไซต์โดยวิธี Cryoloop ใช้ ethylene glycol ร่วมกับซูโครสเพื่อแช่แข็งโอโอไซต์ 64 ใบ ผลการวิจัยพบว่ามีอัตราการรอดชีวิตของโอโอไซต์เท่ากับ 90.8 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการปฏิสนธิของโอโอไซต์เท่ากับ 89.6 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการตั้งครรภ์เท่ากับ 41.4 เปอร์เซ็นต์ ต่อการย้ายฝาก และมีชีวิตรอดเกิดขึ้นได้ และต่อเนื่องกับอัตราการตั้งครรภ์ต่อการย้ายฝากเท่ากับ 34.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวนเฉลี่ยของตัวอ่อนในการย้ายฝากเท่ากับ 2.2 เปอร์เซ็นต์

การแช่แข็งแบบ Cryoloop ทำได้โดยใช้ห่วงที่ทำจากเส้นด้ายในลอนซึ่งต่อกับค้ำจับโลหะสแตนเลส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของห่วง 20 ไมครอน จุ่มในสารป้องกันการแช่แข็งที่มีไอโอไอโซลเพื่อนำไอโอไอโซลและสารป้องกันการแช่แข็งเพียง 0.5-1 ไมโครลิตร บรรจุในห่วง นำห่วงพร้อมค้ำจับใส่ลงในหลอด 2 มิลลิลิตร แล้วแช่ในโตรเจนเหลวทันที (ดวงใจ, 2550)

ข้อดีของการใช้ Cryoloop คือ การลดเวลาในการแช่แข็งเนื่องจาก สารละลายและไอโอไอโซลสัมผัสกับในโตรเจนเหลวโดยตรง และ ปริมาตรของของเหลวที่ไอโอไอโซลแช่อยู่มีปริมาณน้อยมาก (1-2 ไมโครลิตร) นอกจากนี้ยังทำให้การละลายทำได้สะดวกขึ้น การบรรจุไอโอไอโซลสามารถทำได้อย่างรวดเร็ว (ดวงใจ, 2551)

#### 4. วิธีการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชัน โดยใช้ solid surface (SSV)

การแช่แข็งวิธี SSV เป็นวิธีที่ถูกพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 2000 โดย Dinnyes และคณะ (Dinnyes *et al.*, 2000) เพื่อพยายามลดปริมาณสารละลายป้องกันการแช่แข็งให้น้อยที่สุด และเพิ่มอัตราความเร็วในการแช่แข็งให้เร็วมากที่สุดโดยหยดกลุ่มไอโอไอโซลประมาณ 10-15 ใบ ในสารละลายที่มีสารป้องกันการแช่แข็ง 5 ไมโครลิตรบนผิวโลหะที่เย็นจัดจากการหล่อในในโตรเจนเหลว เก็บหยดไอโอไอโซลที่แช่แข็งใส่ลงในหลอดพลาสติก

ข้อดีของการใช้ SSV คือ ในโตรเจนเหลวสัมผัสโดยตรงกับสารละลายและไอโอไอโซล ปริมาตรของของเหลวที่ไอโอไอโซลแช่อยู่น้อยกว่าการใช้หลอดพลาสติกขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ใช้ในวิธีการแช่แข็งวิทริฟิเคชัน ทำให้ลดเวลาขั้นตอนการแช่แข็งลงได้มาก การทำละลายทำให้ไอโอไอโซลสัมผัสกับสารโดยตรงทำให้การแพร่ผ่านของสารเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (ดวงใจ, 2551)

#### การตรวจสอบคุณลักษณะของไอโอไอโซลหลังจากการทำแช่แข็งวิทริฟิเคชัน

การศึกษาลักษณะความผิดปกติของโครงสร้างของไอโอไอโซลที่ผ่านการแช่แข็งเป็นการทดสอบเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาไอโอไอโซลต่อไป

วิธีการตรวจสอบคุณลักษณะของไอโอไอโซลหลังจากการแช่แข็งวิทริฟิเคชันสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับความต้องการ การศึกษาการรอดชีวิตของไอโอไอโซลทำได้โดยการย้อมด้วย propidium iodide (PI) ไอโอไอโซลที่ตายจะติดสีของ PI เนื่องจาก PI จะสามารถแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้า

ไปในไซโตพลาสซึม (Abe *et al*, 2000) การย้อมสีของโอโอไซต์จะใช้ PI ที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมใน mPBS-PVA และย้อมนาน 15 นาทีในที่มืด ตรวจสอบการติดสีของโอโอไซต์ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ (Lee *et al*, 2007) นอกจากนี้ Hanna และคณะ(2008) ได้ตรวจสอบการมีชีวิตรอดโดยย้อมสีด้วย 5-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (5 - CFDA, SE) สารนี้จะถูกเปลี่ยนให้เป็นสารเรืองแสงด้วยเอนไซม์ในไซโตพลาสซึม โอโอไซต์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์สีเขียวเมื่อตรวจภายใต้แสงที่มีความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร

การตรวจสอบความสมบูรณ์ของโอโอไซต์หลังจากที่ได้มีการเก็บรักษาโอโอไซต์ภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำทำได้โดยตรวจสอบโครงสร้างดังต่อไปนี้ ได้แก่ โครโมโซม ตรวจสอบโดยการย้อมสีด้วย aceto-orcein หรือสี Hoechst 33342 (Hanna, 2008) และย้อมโครโมโซมด้วย PI ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 -20 นาที สีของ PI จะติดในไซโตพลาสซึมแต่จะไม่ติดโครโมโซมจะทำให้เห็นโครโมโซมกระจายตัวอยู่ในไซโตพลาสซึม (Shi *et al*, 2007) การศึกษาโครงสร้างของไมโทริบูล ทำได้โดยวิธีวิธี immunofluorescence (Rho *et al*, 2000) การศึกษาการมีอยู่ของ cortical granules ด้วยวิธี cytochemistry โดยย้อมโอโอไซต์ด้วย เลคติน *Lens culinaris agglutinin* (LCA) ซึ่งจะจับได้เฉพาะกับผนังของ cortical granule (Ghetlet *et al*, 2006) และ การตรวจสอบความเสียหายของ ZP จากความหนาของ ZP หลังการย้อมด้วย Periodic acid Schiff (PAS) (Neeta and Suneeta, 2009) เป็นต้น และตรวจสอบความสามาถการปฏิสนธิของโอโอไซต์โดยย้อมด้วย mouse anti-chick  $\alpha$ -tubule monoclonal antibody ความสามารถในการปฏิสนธิของโอโอไซต์ โดยจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงการทำหน้าที่ของโอโอไซต์ โดยวิธี Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) โดยการฉีดอสุจิเข้าไปในโอโอไซต์ หลังจากนั้นตรวจสอบการเกิด cleavage และ blastocysts (Shi *et al*, 2007)

#### การทำละลาย (Thawing)

คือการนำเซลล์ที่เก็บแช่แข็งไว้มาทำให้ละลาย และเพาะเลี้ยงให้เจริญต่อไปได้ ซึ่งวิธีการละลาย นั้นขึ้นอยู่กับวิธีการแช่แข็ง ถ้าเป็นการแช่แข็งด้วยวิธีลดอุณหภูมิอย่างช้า ที่ทำให้เย็นถึง -30 องศาเซลเซียส การละลายก็จะทำอย่างรวดเร็วโดยการนำหลอดบรรจุเซลล์ใส่น้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การละลายทำโดยปรับให้อุณหภูมิค่อยๆ สูงขึ้นที่อัตรา 8 - 10 องศาเซลเซียสต่อนาที เมื่อละลายแล้วจึงค่อยๆ นำเซลล์ใส่น้ำยาเลี้ยงเซลล์ต่อไป (อร่าม และ สมพร, 2539)

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. รังไข่ของสุนัขเพศเมียอายุระหว่างช่วงอายุ 8 เดือน ถึง 2 ปี
2. มีดผ่าตัด
3. กระจกน้ำร้อน
4. จานเพาะเลี้ยงเซลล์
5. ปิเปต (pipette)
6. พาสเจอร์ปิเปต (paster pipette)
7. ปากคีบ (forcep)
8. กระจกตวง (cylinder)
9. ก่อตั้งจุลทรรศน์แบบธรรมดา
10. ตู้บ่มที่ควบคุมปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และอุณหภูมิ (carbon dioxide incubator)
11. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)
12. เครื่องชั่งสารเคมีชนิดละเอียด (analytical balance)
13. ก่อตั้งจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซน
14. กรรไกรผ่าตัด

## สารเคมี

1. TCM 199 medium
2. fetal bovine serum
3. ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin G/streptomycin
4. ethylene glycol
5. trehalose
6. phosphate buffer saline (PBS)
7. propidium iodide
8. periodic acid Schiff
9. biotinylated *Pisum sativum* agglutinin (PSA)
10. biotinylated succinylated-wheat germ agglutinin (s-WGA)
11. biotinylated *Lycopersicon esculentum* lectin (LEL)
12. biotinylated *Griffonia simplicifolia* lectin-II (GSL-II)
13. biotinylated *Vicia villosa* agglutinin (VVA)
14. biotinylated *Erythrina cristagalli* lectin (ECL)
15. Bouin's fluid
16. xylene
17. Fluoresceine Avidin D
18. Rhodamine Avidin D

## วิธีการ

### การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างรังไข่ของสุนัขเพศเมียที่มีช่วงอายุ 8 เดือน ถึง 2 ปี จำนวน 10 ตัวที่อยู่ในวงรอบการเป็นสัดในระยะ proestrus และ estrus โดยดูจากบริเวณผิวหนังของรังไข่ที่มองเห็นค่อมแดงนูน โดยได้รับการผ่าตัดทำหมันจากศูนย์บริการสาธารณสุขบางเขน 24 โดยนำไปใส่ลงใน TCM 199 medium ที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ประมาณ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำมายังห้องปฏิบัติการ (Abe *et al*, 2008)

### การเก็บแยก COCs ออกจากรังไข่

นำรังไข่ของสุนัขเพศเมียมาทำความสะอาดโดยการนำมาเอาไขมันและเส้นเลือดออกให้หมดและวางลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี TCM 199 medium ที่ผสม 10% fetal bovine serum และเสริมด้วย penicillin G เข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ streptomycin sulfate เข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที และนำมีดผ่าตัดมาผ่ารังไข่ออกเป็นสองซีกแล้วทำการฉีกเนื้อรังไข่ซ้ำหลายๆครั้งจนเป็นชิ้นเล็กๆ เป็นระยะเวลา 30 นาที และคัดแยกโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นเวลา 30 นาที โดยคัดเลือก COCs ที่มี cumulus cell ล้อมรอบโอโอไซต์ 2-3 ชั้นขึ้นไป มีเม็ดไขมันสีดำภายในไซโตพลาสซึม และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 100 ไมโครเมตร (Abe *et al*, 2008)

### วิธีการแช่แข็ง

นำ COCs ที่คัดเลือกมารังไข่ทั้ง 2 ข้างของสุนัขแต่ละตัวมาใส่ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี PB1 medium ซึ่งประกอบด้วย ethylene glycol 1 โมลาร์ และ trehalose 0.25 โมลาร์ ใน TCM 199 medium แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 5 กลุ่มด้วยกัน คือ 1) กลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง 2) กลุ่ม COCs ผ่าน equilibration medium และ vitrification medium ที่มีความเข้มข้นของ EG 1.5 โมลาร์ แต่ไม่ผ่านการแช่แข็ง 3) กลุ่ม COCs ผ่าน equilibration medium และ vitrification medium ที่มีความเข้มข้นของ EG 3 โมลาร์ แต่ไม่ผ่านการแช่แข็ง 4) กลุ่ม COCs ผ่าน equilibration medium และ vitrification medium ที่มีความเข้มข้นของ EG 1.5 โมลาร์ ผ่านการแช่แข็ง 5) กลุ่ม COCs ผ่าน equilibration medium และ vitrification medium ที่มีความเข้มข้นของ EG 3 โมลาร์ ผ่านการแช่แข็ง

1. กลุ่มการทดลองที่ 1 COCs จะถูกเลี้ยงใน TCM 199 เสริมด้วย 10% FBS ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C โดยไม่ผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

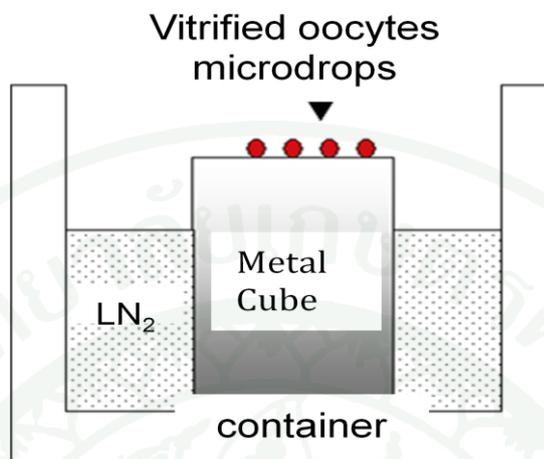
2. กลุ่มการทดลองที่ 2 COCs จะถูกบ่มใน equilibration medium ซึ่งประกอบด้วย 4% ethylene glycol (EG) ใน TCM 199 เสริมด้วย 20% fetal bovine serum เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิที่ 4°C และล้าง 3 ครั้ง ใน vitrification medium ที่ประกอบด้วย TCM 199 medium, trehalose 0.5 โมลาร์, EG 1.5 โมลาร์และเสริมด้วย 20% fetal bovine serum ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C เป็นเวลาครั้งละ 20-25 วินาที โดยไม่ผ่านการแช่แข็ง

3. กลุ่มการทดลองที่ 3 COCs จะถูกบ่มใน equilibration medium ซึ่งประกอบด้วย 4% ethylene glycol (EG) ใน TCM 199 เสริมด้วย 20% fetal bovine serum เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิที่ 4°C และล้าง 3 ครั้ง ใน vitrification medium ที่ประกอบด้วย TCM 199 medium, trehalose 0.5 โมลาร์, EG 3 โมลาร์และเสริมด้วย 20% fetal bovine serum ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C เป็นเวลาครั้งละ 20-25 วินาที โดยไม่ผ่านการแช่แข็ง

4. กลุ่มการทดลองที่ 4 COCs จะถูกบ่มใน equilibration medium ซึ่งประกอบด้วย 4% ethylene glycol (EG) ใน TCM 199 เสริมด้วย 20% fetal bovine serum เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิที่ 4°C และล้าง 3 ครั้ง ใน vitrification medium ที่ประกอบด้วย TCM 199 medium, trehalose 0.5 โมลาร์, EG 1.5 โมลาร์และเสริมด้วย 20% fetal bovine serum ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C เป็นเวลาครั้งละ 20-25 วินาที โดยผ่านการแช่แข็งด้วยวิธี SSV ทำโดยนำ COCs จำนวน 10-15 ใบวางใน vitrification medium ปริมาตร 5 ไมโครลิตรและหยดลงบนแผ่นโลหะเย็นจัดที่วางบนกล่องโลหะที่แช่ในไนโตรเจนเหลว นำหดยดสารละลายที่มี COCs ใส่งในหลอดพลาสติกโดยใช้ปากคีบที่เย็นจัดในการคีบ และเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 สัปดาห์

5. กลุ่มการทดลองที่ 5 COCs จะถูกบ่มใน equilibration medium ซึ่งประกอบด้วย 4% ethylene glycol (EG) ใน TCM 199 เสริมด้วย 20% fetal bovine serum เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิที่ 4°C และล้าง 3 ครั้ง ใน vitrification medium ที่ประกอบด้วย TCM 199 medium, trehalose 0.5 โมลาร์, EG 3 โมลาร์และเสริมด้วย 20% fetal bovine serum ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C เป็นเวลาครั้งละ 20-25 วินาที โดยผ่านการแช่แข็งด้วยวิธี SSV ทำโดยนำ COCs จำนวน 10-15 ใบวางใน vitrification medium ปริมาตร 5 ไมโครลิตรและหยดลงบนแผ่นโลหะเย็นจัดที่วางบนกล่องโลหะที่แช่ใน

ไนโตรเจนเหลว นำหยดสารละลายที่มี COCs ใส่ลงในหลอดพลาสติกโดยใช้ปากคีบที่เย็นจัดในการคีบ และเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (Dimnyes *et al*, 2000)



ภาพที่ 13 แสดง solid surface vitrification

ที่มา: Dimnyes *et al* (2000)

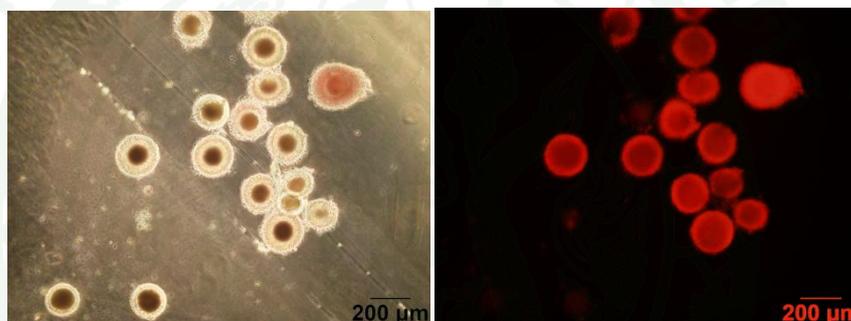
#### วิธีการทำละลาย COCs

เมื่อเก็บรักษา COCs ครบ 1 สัปดาห์ นำหลอดพลาสติกบรรจุ COCs ออกมาจากไนโตรเจนเหลวแล้วใช้ปากคีบที่เย็นคีบหยดสารละลาย COCs ออกมาใส่ในสารละลายที่ประกอบด้วย TCM 199 medium และ trehalose เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นย้าย COCs มาใส่ในสารละลาย TCM 199 medium และ trehalose เข้มข้น 0.25 โมลาร์ และย้ายมาใส่ในสารละลาย TCM 199 medium และ trehalose เข้มข้น 0.125 โมลาร์ โดยในแต่ละสารละลายควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาทีแล้วนำ COCs มาใส่ในสารละลาย base media ซึ่งประกอบด้วย TCM 199 medium เสริมด้วย 20% fetal bovine serum จากนั้นนำมาเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในตู้ควบคุมคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (Begin *et al*, 2003)

## การประเมินคุณภาพของ COCs หลังการแช่แข็ง

### การตรวจสอบการรอดชีวิตของ COCs

หลังจากเลี้ยงโอโอไซต์จากการทดลองทั้ง 5 กลุ่ม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในตู้ควบคุมคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นำโอโอไซต์มาทำการตรวจสอบการรอดชีวิตโดยการย้อมด้วย propidium iodide (PI) โอโอไซต์ที่ตายจะติดสีของ PI เนื่องจาก PI จะสามารถแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปภายในไซโทพลาสซึม (Abe *et al*, 2000) การย้อมสีของโอโอไซต์จะใช้ PI ที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมใน PBS โดยย้อมนาน 15 นาทีในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง และตรวจดูการติดสีของโอโอไซต์ภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ (Lee *et al.*, 2007)



ภาพที่ 14 แสดงภาพโอโอไซต์ที่ย้อมด้วย PI

### การตรวจดูลักษณะทางจุลกายวิภาคของ cumulus-oocyte complexes (COCs) โดยการย้อมสี Hematoxylin & Eosin

หลังจากบ่มโอโอไซต์จากการทดลองทั้ง 5 กลุ่ม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในตู้ควบคุมคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นำโอโอไซต์มาล้าง 3 ครั้งใน TCM 199 medium และทำการคงสภาพโอโอไซต์ด้วย Bouin's fluid เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และทำการขจัดน้ำออกโดยผ่านในสารละลายแอลกอฮอล์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำไปสูง 80%, 95%, 100% และใส่ลงใน xylene เพื่อแทนที่น้ำในเนื้อเยื่อ อย่างละ 2 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 rpm 10 นาทีตามลำดับ หลังจากนั้นฝังโอโอไซต์ลงในพาราฟิน โดยการอัดความดันเป็นเวลา 30 นาที และทำ embed เป็น paraffin block และนำมาตัด section ให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร และทำการอบไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการขจัดพาราฟินออกโดยการ แช่ใน

xylene ครั้งที่ 1เป็นเวลา 5 นาที และ xylene ครั้งที่ 2 เป็นเวลา 4 นาทีและทำการเอาน้ำเข้าเซลล์โดยผ่านแซ่สารละลายแอลกอฮอล์ที่ระดับความเข้มข้นสูงไปต่ำ 100%, 95%, 80% และนำมาทำการย้อมสี H&E ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

**การตรวจดูลักษณะทางจุลกายวิภาคของ cumulus-oocyte complexes (COCs) โดยการย้อมสี periodic acid Schiff (PAS)-hematoxylin (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hewitt *et al.*, 1998 และ Rodrigues *et al.*, 2004)**

หลังจากบ่มโอโอไซต์จากการทดลองทั้ง 5 กลุ่ม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในตู้ควบคุมคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นำโอโอไซต์มาล้าง 3 ครั้งใน TCM 199 medium และทำการคงสภาพโอโอไซต์ด้วย Bouin's fluid เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และทำการขจัดน้ำออกโดยผ่านในสารละลายแอลกอฮอล์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำไปสูง 80%, 95%, 100% และใส่ลงใน xylene เพื่อแทนที่น้ำในเนื้อเยื่อ อย่างละ 2 ครั้ง โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 rpm 10 นาทีตามลำดับ หลังจากนั้นฝังโอโอไซต์ลงในพาราฟิน โดยการอัดความดันเป็นเวลา 30 นาที และทำ embed เป็น block paraffin และนำมาตัด section ให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร และทำการอบไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาทำการย้อมสีด้วย periodic acid Schiff (PAS)-hematoxylin ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจดูการติดสี PAS ที่ zona pellucida และวัดความหนาของ zona pellucida จากภาพถ่ายด้วยโปรแกรม image analysis (Rodrigues *et al.*, 2004)

**การตรวจดูลักษณะของโครงสร้าง zona pellucida (ZP) โดยวิธี Lectin Histochemistry (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Verini-Supplizi *et al.*, 1996 และ Hewitt *et al.*, 1998)**

หลังจากบ่มโอโอไซต์จากการทดลองทั้ง 5 กลุ่ม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในตู้ควบคุมคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นำโอโอไซต์มาล้าง 3 ครั้งใน TCM 199 medium และทำการคงสภาพโอโอไซต์ด้วย Bouin's fluid เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และทำการขจัดน้ำออกโดยผ่านในสารละลายแอลกอฮอล์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำไปสูง 80%, 95%, 100% และใส่ลงใน xylene เพื่อแทนที่น้ำในเนื้อเยื่อ อย่างละ 2 ครั้ง โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 rpm 10 นาทีตามลำดับ หลังจากนั้นฝังโอโอไซต์ลงในพาราฟิน โดยการอัดความดันเป็นเวลา 30 นาที และทำ embed เป็น paraffin block และนำมาตัด section ให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร และทำการอบไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Verini-Supplizi *et al.*, 1996) หลังจากนั้นนำ

เนื้อเยื่อมาบ่มด้วยสารละลาย Lectin ที่ติดฉลากด้วย biotin อันประกอบด้วย *Pisum sativum* agglutinin (PSA), Succinylated-wheat germ agglutinin (s-WGA), *Lycopersicon esculentum* lectin (LEL), *Griffonia simplicifolia* lectin-II (GSL-II), *Vicia villosa* agglutinin (VVA) และ *Erythrina cristagalli* lectin (ECL) โดยใช้ Lectin แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 5-20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Blackmore *et al.*, 2004) สไลด์ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมจะบ่มสไลด์ด้วยสารละลาย lectin กับ สารละลายน้ำตาลที่จำเพาะต่อ lectin แต่ละชนิด (ตารางที่ 3) ที่เข้มข้น 0.2-0.4 โมลาร์ เดิม Fluorescein-conjugated Avidin D และ/หรือ Rhodamine -conjugated Avidin D หลังจากนั้นนำ สไลด์บ่มใน humidified chamber เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องในที่มืด ต่อมานำมาล้าง 3 ครั้ง ใน PBS แล้วนำมาทำการ mount ด้วย mounting medium และนำไปทำการศึกษาโดยใช้กล้อง epifluorescence microscope (Blackmore *et al.*, 2004 and Verini-Supplizi *et al.*, 1996)

ตารางที่ 3 แสดง Lectin และหมู่ น้ำตาลที่จับกับ Lectin ที่ใช้ในการทดสอบ

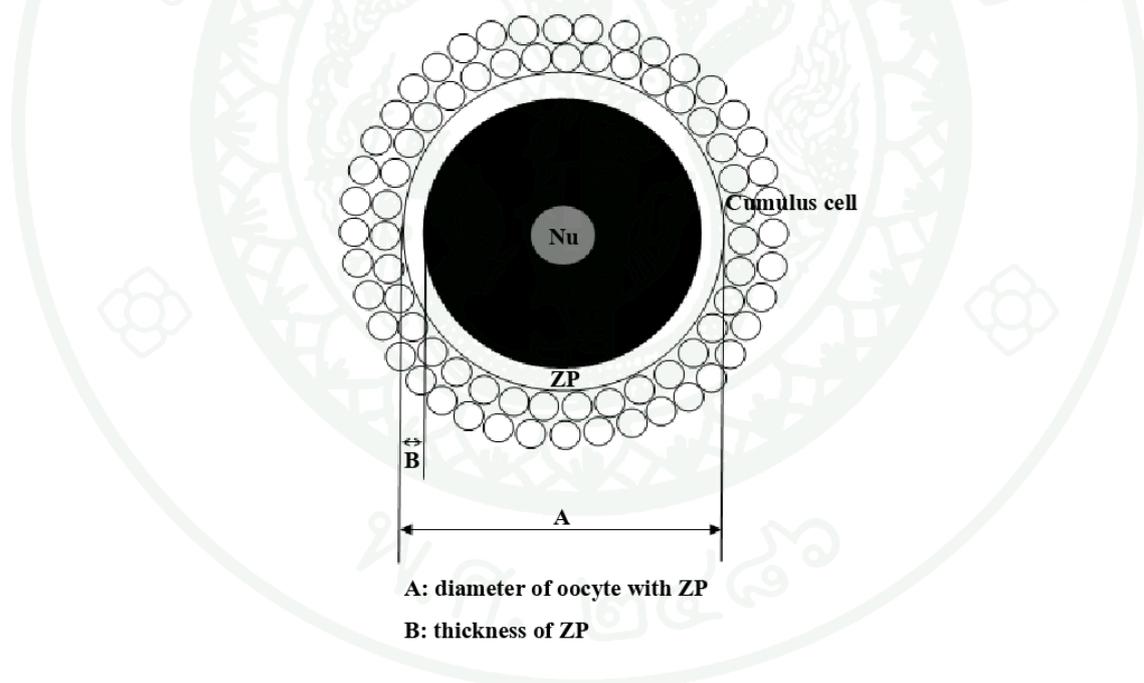
Lectins	หมู่ น้ำตาลที่ lectin จับ
<i>Pisum sativum</i> agglutinin (PSA)	$\alpha$ -Mannose
Succinylated-wheat germ agglutinin (s-WGA)	$\alpha$ -D-N-acetylglucosamine
<i>Lycopersicon esculentum</i> lectin (LEL)	$\alpha$ -D-N-acetylglucosamine
<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin-II (GSL-II)	$\alpha$ - and $\beta$ -D-N-acetylglucosamine
<i>Vicia villosa</i> agglutinin (VVA)	$\beta$ -D-N-acetylgalactosamine
<i>Erythrina cristagalli</i> lectin (ECL)	$\beta$ -D-galactose(1,4) N-acetylgalactosamine

ที่มา: Blackmore *et al.* (2004)

### การวัดขนาดของ Oocyte และขนาดของ Zona pellucida

ขนาดของ oocyte คำนวณจากโปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus) ในการใช้วัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ oocyte โดยใช้ COCs จากการย้อมด้วย H&E และ PAS ที่มองเห็นนิวเคลียสอยู่บริเวณกลางเซลล์ โดยวัดจำนวนสองเส้นตัดกันผ่านกลางเซลล์ และวัดจำนวน 10 ตัวอย่างในแต่ละกลุ่มการทดลอง และนำมาหาค่าเฉลี่ยดังรูปที่ 15

ขนาดของ Zona pellucida โดยคำนวณจากโปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus) ในการใช้วัดขนาดของ Zona pellucida โดยใช้ COCs จากการย้อมด้วย H&E และ PAS ที่มองเห็นนิวเคลียสอยู่บริเวณกลางเซลล์ วัดบริเวณขอบของโอโอไซต์ที่มีการติดสีของ Hematoxyline และสีของ PAS ดังรูปที่ 15 วัดจำนวนกลุ่มการทดลองละ 10 ตัวอย่าง วัดจำนวน 30 จุกรอบโอโอไซต์ และนำมาหาค่าเฉลี่ยดังรูปที่ 15



ภาพที่ 15 ภาพแสดงการวัดขนาดโอโอไซต์ และ zona pellucida ของสุ่น้ำ

### การวิเคราะห์ความเข้มของการติดของ Lectin

การวิเคราะห์ความเข้มของเลคตินทำโดยการคำนวณจากโปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus) โดยวิเคราะห์จากการวัดความเข้มของ fluorescence ที่ติดฉลากบนเลคตินจากจำนวน 30 ตัวอย่างในแต่ละกลุ่มการทดลอง และนำมาหาค่าเฉลี่ย และนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาทำการจัดกลุ่มในการให้คะแนนโดยแบ่งกลุ่มการให้คะแนนเป็น 4 กลุ่มคือ คะแนนน้อยกว่า 1 เป็น -, ไม่ติด lectin; ช่วงคะแนน 1-15 เป็น +, ติดสีอ่อน; ช่วงคะแนน 16-30 เป็น ++ ติดสีปานกลาง; ช่วงคะแนนมากกว่า 30 เป็น +++ ติดสีเข้ม

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ร้อยละของการรอดชีวิตของโอโอไฮต์ระหว่างกลุ่มการทดลองจะถูกเปรียบเทียบโดยใช้วิธีรูปแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) และจะถูกเปรียบเทียบโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Comparison Test โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 17.0 และกำหนดระดับความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 95% ( $P < 0.05$ )

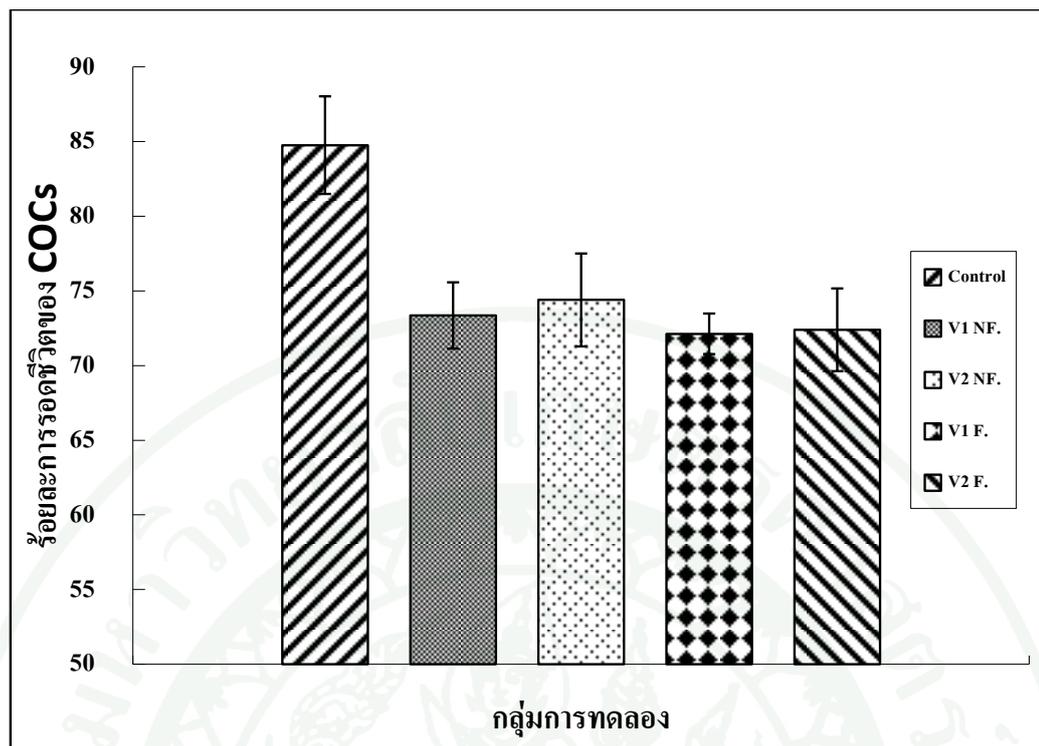
## ผลและวิจารณ์

### ผล

#### ร้อยละการรอดชีวิตของ COCs

ผลการศึกษาร้อยละการรอดชีวิตของ COCs ด้วยการข้อมด้วย PI แสดงร้อยละการรอดชีวิตของ COCs จากกลุ่มการทดลองทั้ง 5 กลุ่ม โดยแสดงค่าเฉลี่ยพร้อมค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละกลุ่มการทดลองที่มีจำนวนสุนัขกลุ่มละ 5 ตัว ร้อยละการรอดชีวิตของ COCs ในกลุ่มควบคุมและการทดลองที่ 2-5 เท่ากับ 84.77 เปอร์เซ็นต์, 73.36 เปอร์เซ็นต์, 74.40 เปอร์เซ็นต์, 72.13 เปอร์เซ็นต์ และ 72.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 4 และภาพที่ 15 โดยพบว่าร้อยละการรอดชีวิตของ COCs ในกลุ่มควบคุมมีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของ EG ที่มีต่อร้อยละการรอดชีวิต พบว่ากลุ่มที่แฉสารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง ที่มีค่าเท่ากับ  $73.36 \pm 2.22$  เปอร์เซ็นต์ และ  $74.40 \pm 3.11$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ กลุ่มที่แฉสารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ โดยผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV มีค่าเท่ากับ  $72.13 \pm 1.36$  เปอร์เซ็นต์ และ  $72.40 \pm 2.77$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติ (ดังภาพที่ 15 และ ตารางที่ 4)

ผลของการแช่แข็งวิธี SSV ที่มีต่อร้อยละการรอดชีวิตของ COCs พบว่า COCs ที่แช่ในสารละลายที่มีระดับความเข้มข้นของ EG เดียวกันไม่ว่าจะเป็น ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 หรือ 3.0 โมลาร์ มีร้อยละการรอดชีวิตของ COCs ที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อเทียบกลุ่มการทดลองทุกกลุ่มที่กล่าวมากับกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มไอโอไอโซต์ชนิดสด ที่มีร้อยละการรอดชีวิตของ COCs เท่ากับ  $84.77 \pm 3.27$  เปอร์เซ็นต์ ก็พบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )



ภาพที่ 16 กราฟแสดง % การรอดชีวิตของ COCs ในแต่ละกลุ่มการทดลองและแสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

หมายเหตุ: Control, กลุ่มควบคุม; V1 N.F., COCs ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M); V2 N.F., COCs ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M); V1 F., COCs ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification; V2 F., COCs ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification

ตารางที่ 4 แสดงอัตราการรอดชีวิตของ COCs %ค่าเฉลี่ย และ ค่าความแปรปรวน

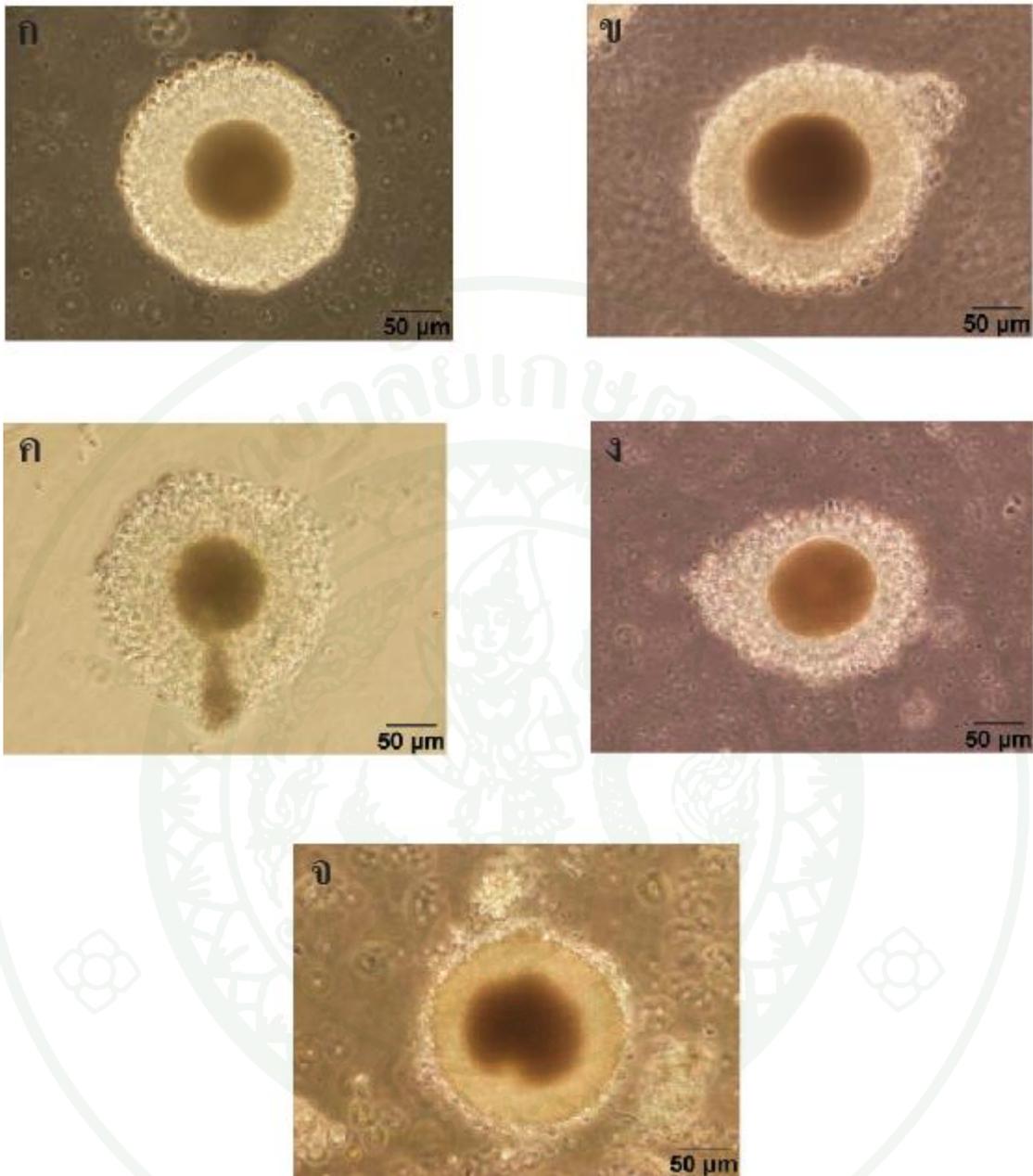
สุนัข	การทดลอง									
	COCs ชนิดสด		ชนิดเชื้อสารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M)		ชนิดเชื้อสารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M)		ชนิดเชื้อสารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M) และผ่านการแช่แข็ง		ชนิดเชื้อสารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) และผ่านการแช่แข็ง	
	จำนวน COCs ที่ตรวจสอบ	จำนวน COCs (%) ที่รอดชีวิต	จำนวน COCs ที่ตรวจสอบ	จำนวน COCs (%) ที่รอดชีวิต	จำนวน COCs ที่ตรวจสอบ	จำนวน COCs (%) ที่รอดชีวิต	จำนวน COCs ที่ตรวจสอบ	จำนวน COCs (%) ที่รอดชีวิต	จำนวน COCs ที่ตรวจสอบ	จำนวน COCs (%) ที่รอดชีวิต
1	20	17(85%)	30	23(76.67%)	30	21(70%)	30	22(73.33%)	30	22(73.33%)
2	24	20(83.33%)	24	17(70.83%)	24	22(73.33%)	30	22(73.33%)	30	21(70%)
3	40	35(87.5%)	50	37(74%)	50	35(78%)	50	36(72%)	50	35(70%)
4	20	16(80%)	30	22(73.33%)	30	23(76.67%)	30	21(70%)	30	23(76.67%)
5	50	44(88%)	50	32(72%)	50	37(74%)	50	36(72%)	50	36(72%)
Mean		84.77% <sup>ก</sup>		73.36% <sup>ข</sup>		74.40% <sup>ข</sup>		72.13% <sup>ข</sup>		72.40% <sup>ข</sup>
SD		3.27		2.22		3.11		1.36		2.77

หมายเหตุ: ก และ ข ในแถวแนวนอนเดียวกันต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05)

## การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Cumulus-oocyte complexes

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของ cumulus-oocyte complexes จาก phase contrast

จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างของ COCs ที่ได้จากกลุ่มทดลองทุกกลุ่มด้วย phase contrast COCs ของสุนัขที่ปกติมีลักษณะของโอโอไซต์ที่ภายในไซโตพลาสซึมมองเห็นเป็นสีดำจาก lipid yolk droplet และพบมี cumulus cell ล้อมรอบโอโอไซต์มากกว่า 2 ชั้นขึ้นไป และเห็นชั้นของ ZP มีลักษณะวาวใสล้อมรอบโอโอไซต์ ภายหลังการทดลองพบมีความผิดปกติกับ COCs ที่โครงสร้างส่วนต่างๆ ได้แก่ พบลักษณะการเกิด mass cumulus cell นอกชั้น cumulus cell เห็นเป็นลักษณะของกลุ่ม cumulus cell มารวมตัวกันเป็นกลุ่มเป็นก้อน อาจพบการรั่วไหลของไซโตพลาสซึมออกนอกโอโอไซต์ cumulus cell หลุดหายไปทำให้ชั้นของ cumulus cell ที่ล้อมรอบโอโอไซต์บางลง หรืออาจพบว่าไม่มี cumulus cell เหลืออยู่เลย ดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 แสดงภาพลักษณะโครงสร้างของ COCs (ก) ลักษณะ COCs ที่ปกติ (ข) ลักษณะของ mass cumulus cell (ค) ลักษณะของไซโตพลาสซึมลั่ว (ง) ลักษณะของ cumulus cell บางส่วนกระจายหลุดหายไป (จ) ลักษณะของ cumulus cell ทั้งหมดกระจายหลุดหายไป และไซโตพลาสซึมเล็หาย

### การศึกษาขนาดของโอโอไซต์และความหนาของ zona pellucida

จากการศึกษาขนาดของโอโอไซต์พบว่าขนาดของโอโอไซต์ในกลุ่มควบคุมหรือโอโอไซต์ชนิดสดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 100.11 ไมโครเมตร เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันแต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่แช่แข็งไข่ EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์พบว่ามีความแตกต่างกัน และขนาดของโอโอไซต์ในกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 97.99 และ 98.17 ไมโครเมตร เมื่อทำการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างทั้งสองกลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน และขนาดของโอโอไซต์ในกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV ทั้งที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 93.35 และ 93.66 ไมโครเมตร เมื่อทำการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างทั้งสองกลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 โมลาร์ กับกลุ่มที่แช่แข็งไข่ EG เข้มข้น 1.5 โมลาร์ พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ กลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 3 โมลาร์ กับกลุ่มที่แช่แข็งไข่ EG เข้มข้น 3 โมลาร์ พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน

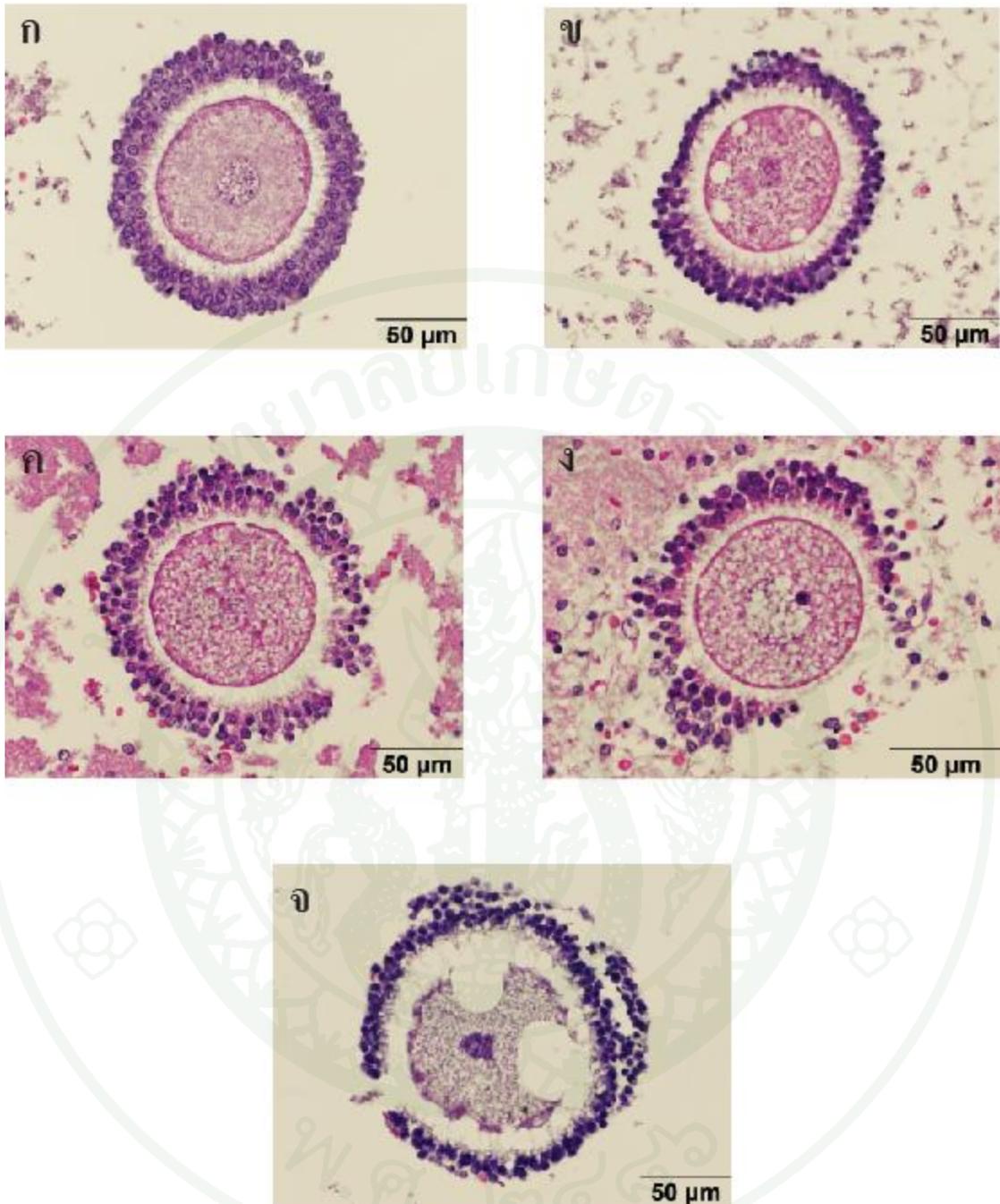
ความหนาของ ZP ในกลุ่มควบคุมมีขนาดเท่ากับ 1.83 ไมโครเมตร เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 โมลาร์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันแต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 3 โมลาร์พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ และเปรียบเทียบกับกลุ่มที่แช่แข็งไข่ EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์พบว่ามีความแตกต่างกัน และความหนาของ ZP ในกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ มีความหนาของ ZP เท่ากับ 1.72 และ 1.35 ไมโครเมตร เมื่อทำการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างทั้งสองกลุ่มพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ และความหนาของ ZP ในกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV ทั้งที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ มีขนาดเท่ากับ 1.29 และ 1.27 ไมโครเมตร เมื่อทำการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างทั้งสองกลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 โมลาร์ กับกลุ่มที่แช่แข็งไข่ EG เข้มข้น 1.5 โมลาร์ พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 5 แสดงขนาดของโอโอไซต์ และ ความหนาของ zona pellucida

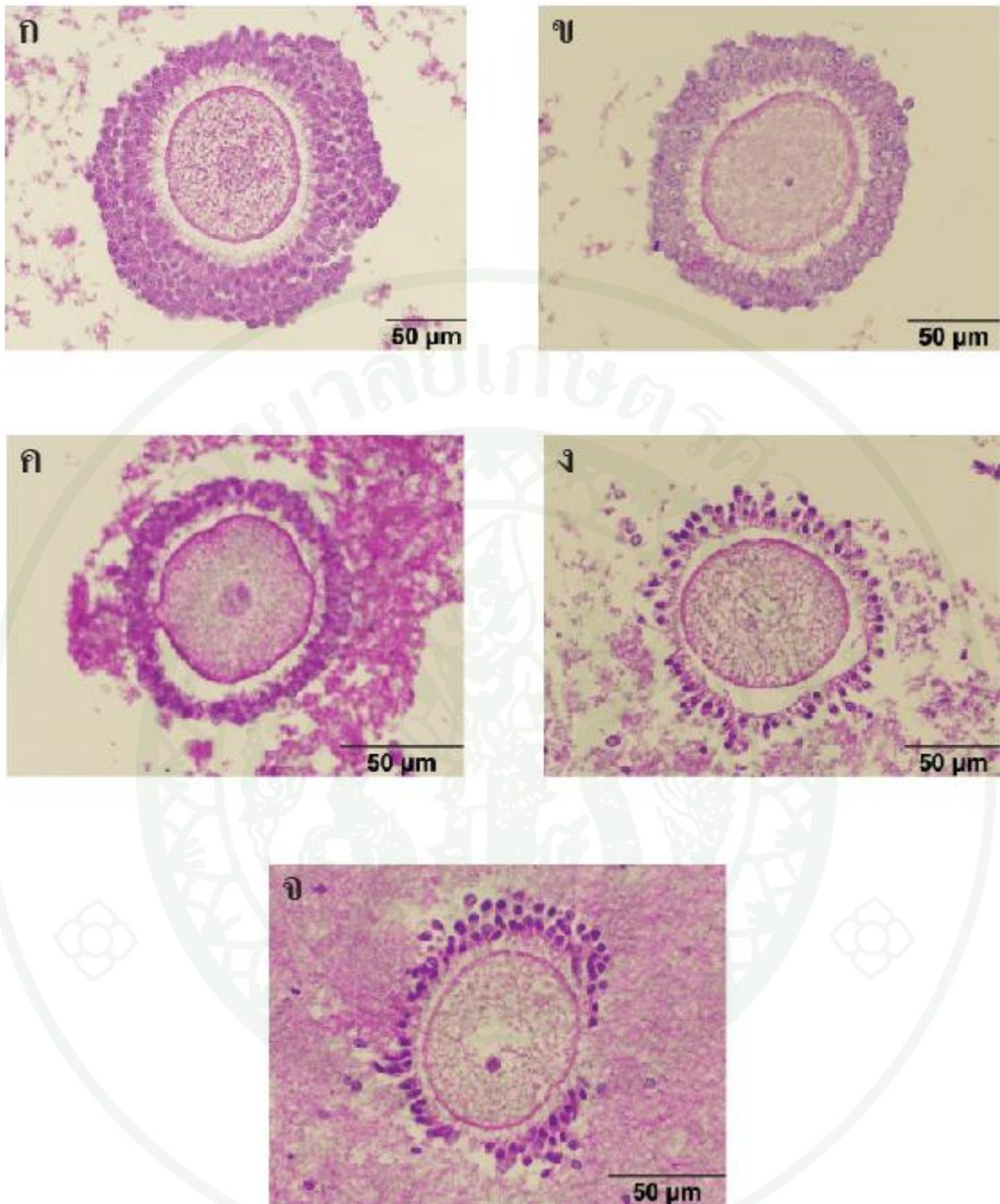
ชนิดของโอโอไซต์	ขนาดของโอโอไซต์	ความหนาของ ZP
โอโอไซต์ชนิดสด	100.11 ± 1.95 <sup>n</sup>	1.83 ± 0.14 <sup>n</sup>
โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M)	97.99 ± 1.33 <sup>n</sup>	1.72 ± 0.18 <sup>n</sup>
โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3.0 M)	98.17 ± 1.04 <sup>n</sup>	1.35 ± 1.31 <sup>n</sup>
โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M) และผ่านการแช่แข็ง	93.35 ± 1.95 <sup>u</sup>	1.29 ± 0.07 <sup>n</sup>
โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3.0 M) และผ่านการแช่แข็ง	93.66 ± 1.84 <sup>u</sup>	1.27 ± 0.07 <sup>u</sup>

**การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของ Cumulus-oocyte complexes โดยการย้อมสี Hematoxylin & Eosin และ periodic acid shift**

จากการย้อมสี Hematoxylin & Eosin เพื่อดูลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของโครงสร้างของ COCs พบว่าลักษณะปกติของโอโอไซต์มีดังนี้ โอโอไซต์กลมมี cumulus cell ล้อมรอบหลายชั้น และภายในพบนิวเคลียสที่มี nucleolus ลักษณะภายในไซโตพลาสซึมพบมีการกระจายของ lipid yolk droplets ซึ่งติดสี eosinophilic และพบการติดสี eosinophilic ของ zona pellucida ซึ่งมีลักษณะเป็นวงแหวนล้อมรอบโอโอไซต์ ดังภาพที่ 18 (ก) ความผิดปกติที่เกิดขึ้นภายใน COCs ที่พบได้แก่ ในไซโตพลาสซึมพบมีลักษณะของ cytoplasmic vacuole เกิดขึ้นเมื่อทำการย้อมสีจะเห็นลักษณะเป็นช่องกลมไม่ติดสีภายในไซโตพลาสซึม ดังภาพที่ 18 (ข) COCs บางส่วน สูญเสีย cumulus cell ไป ดังรูปที่ 18 (จ, ค, ง และ จ) zona pellucida ที่หุ้มโอโอไซต์บางเซลล์ มีลักษณะขาดแหว่งไม่สมบูรณ์ ลักษณะความเสียหายที่เกิดขึ้นกับ zona pellucida นี้จะพบได้อย่างชัดเจนในตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยเทคนิค PAS ดังรูปที่ 19 (ข, ง และ จ) นอกจากนี้ยังพบว่า zona pellucida มีลักษณะเหี่ยวแตกต่างจากลักษณะวงแหวนที่พบในโอโอไซต์ปกติ ดังรูปที่ 19 (ค) ความเสียหายที่เกิดขึ้นอาจพบที่ oolemma ซึ่งมีลักษณะขาดแหว่งเสียหาย ดังภาพที่ 18 (ล และ จ)



**ภาพที่ 18** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของโอโอไซต์ ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin (ก) ลักษณะโอโอไซต์ที่ปกติ (ข) ลักษณะของโอโอไซต์ที่ vacuole และเกิดการกระจายหลุดของ cumulus cell (ค) ลักษณะของโอโอไซต์ที่เกิด vacuole ทำให้ oolemma ขาดแห้วง และเกิด cumulus cell กระจายหลุดออกจากโอโอไซต์ (ง) ลักษณะของโอโอไซต์เกิด cumulus cell กระจายหลุดออกจากโอโอไซต์ (จ) ลักษณะของโอโอไซต์เกิด vacuole ขนาดใหญ่ และเกิด cumulus cell กระจายหลุดออกจากโอโอไซต์

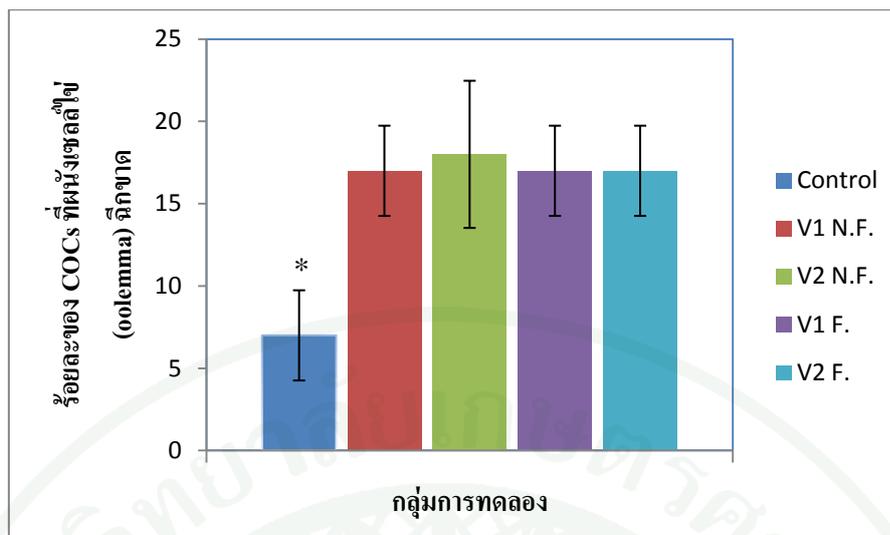


ภาพที่ 19 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของโอโอไซต์ที่ย้อมด้วยสี Periodic acid Schiff (ก) ลักษณะของโอโอไซต์ที่มี zona pellucida สมบูรณ์ (ข) ลักษณะของ zona pellucida แหว่งไม่ครบวงรอบโอโอไซต์ (ค) ลักษณะของ zona pellucida ที่เกิดการเหี่ยวตามลักษณะโอโอไซต์ (ง) ลักษณะของ zona pellucid ที่แหว่งจากการเกิด vacuole (จ) ลักษณะ zona pellucida ที่แหว่ง และมีรูปทรงที่ผิดปกติ

ตารางที่ 6 แสดงร้อยละโอโอไซต์ที่มีความผิดปกติของโครงสร้างต่างๆ

กลุ่ม	การทดลอง	SSV	ร้อยละ COCs ที่มีความผิดปกติของโครงสร้างต่างๆ			
			Oolemma ฉีกขาด	Cytoplasm Vacuole	Zona pellucida เสียหาย	Cumulus cell หลุดกระจาย
1	โอโอไซต์ชนิดสด	ไม่ผ่าน	7±2.74 <sup>n</sup>	14±2.24 <sup>n</sup>	17±2.74 <sup>n</sup>	16±2.24 <sup>n</sup>
2	โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M)	ไม่ผ่าน	17±2.74 <sup>u</sup>	50±3.54 <sup>u</sup>	27±2.74 <sup>u</sup>	78±2.74 <sup>u</sup>
3	โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M)	ไม่ผ่าน	18±4.47 <sup>u</sup>	43±2.74 <sup>n</sup>	27±2.74 <sup>u</sup>	72±2.74 <sup>n</sup>
4	โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification	ผ่าน	17±2.74 <sup>u</sup>	34±4.18 <sup>l</sup>	28±2.74 <sup>u</sup>	72±2.74 <sup>n</sup>
5	โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification	ผ่าน	17±2.74 <sup>u</sup>	42±2.74 <sup>n</sup>	40±3.56 <sup>n</sup>	78±2.74 <sup>u</sup>

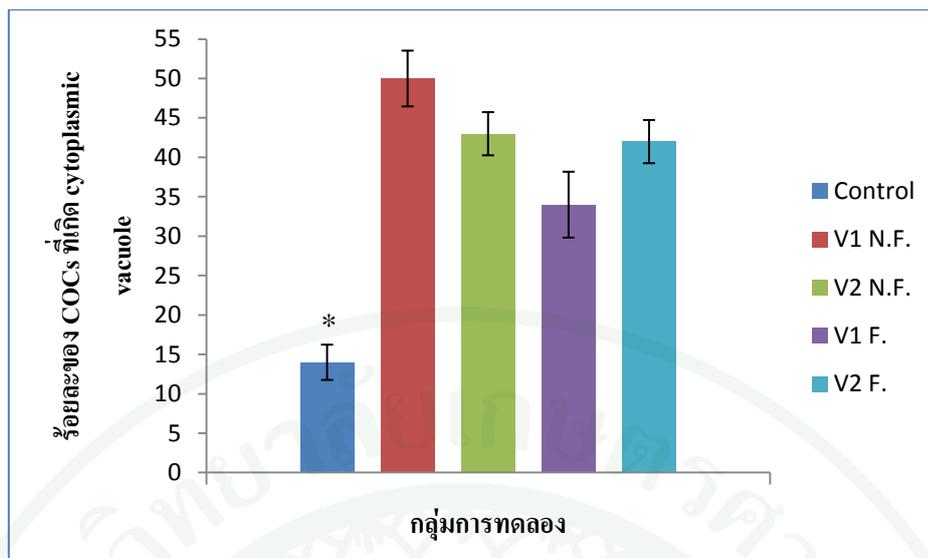
หมายเหตุ: ก และ ข ในแถวเดียวกันต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05)



ภาพที่ 20 ร้อยละของ COCs ที่ผนังเซลล์ไข่ (oolemma) นีกลขาด

### ผลของการแช่แข็งต่อร้อยละของ cumulus-oocyte complexes ที่มีโครงสร้างที่ผิดปกติของผนังเซลล์ไข่ (Oolemma)

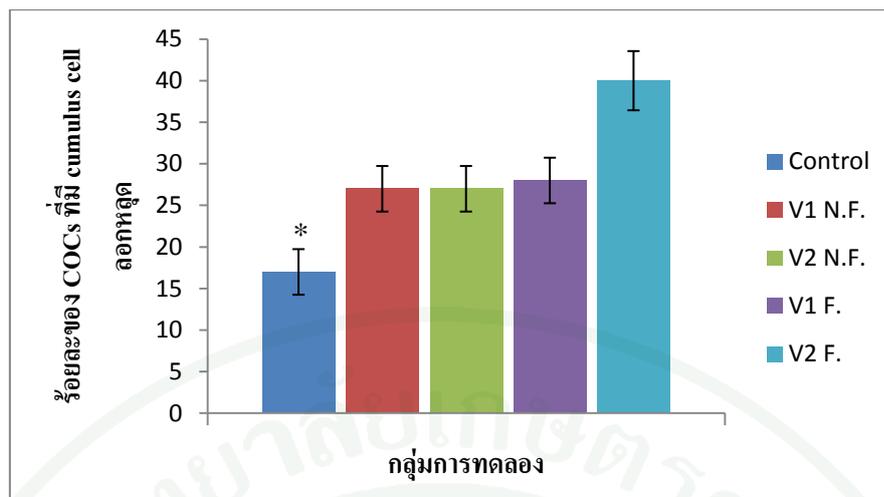
ร้อยละของ COCs ที่มีความผิดปกติของผนังเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับ  $7 \pm 2.74$  เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของ EG ที่มีต่อร้อยละของ COCs ที่มีความเสียหายต่อผนังเซลล์ไข่ พบว่าในกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ โดยไม่ผ่านการแช่แข็งที่มีค่าร้อยละความเสียหายต่อผนังเซลล์ไข่เท่ากับ  $17 \pm 2.74$  เปอร์เซ็นต์ และ  $18 \pm 4.47$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างทั้งสองกลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ขณะที่ร้อยละของ COCs ที่มีความเสียหายต่อผนังเซลล์ไข่ ในกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ ที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV มีค่าเท่ากับ  $17 \pm 2.74$  และ  $17 \pm 2.74$  เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างทั้งสองกลุ่มพบว่าไม่แตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 โมลาร์ทั้งที่ไม่แช่แข็งและแช่แข็งพบว่าไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกันกับการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 3 โมลาร์ ทั้งที่ไม่แช่แข็งและแช่แข็งพบว่าไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 21 ร้อยละของ COCs ที่เกิด cytoplasmic vacuole

**ผลของการแช่แข็งต่อร้อยละของ cumulus-oocyte complexes ที่มีโครงสร้างที่ผิดปกติของการเกิด cytoplasmic vacuole**

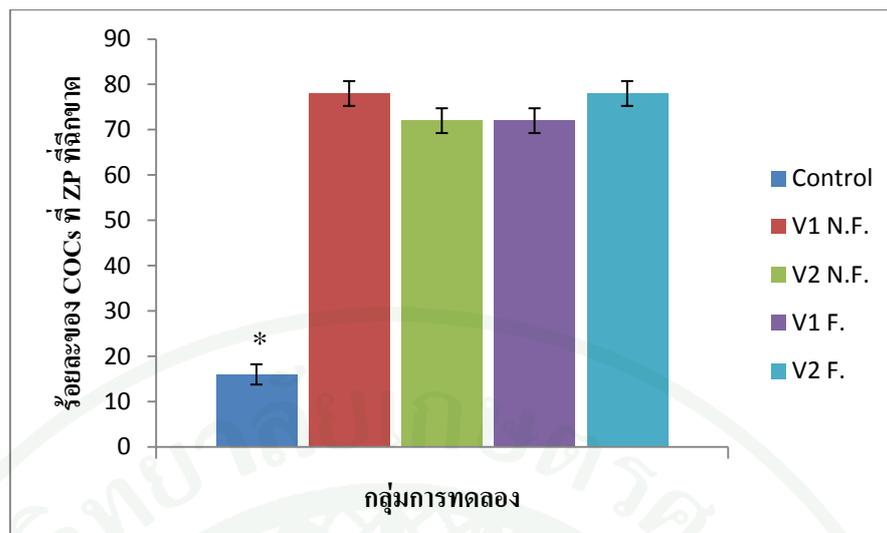
ร้อยละของ COCs ที่มีความผิดปกติของการเกิด cytoplasmic vacuole ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ  $14 \pm 2.24$  เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของ EG ที่มีต่อร้อยละของ COCs ที่เกิด cytoplasmic vacuole พบว่าในกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ โดยไม่ผ่านการแช่แข็งที่มีค่าร้อยละการเกิด cytoplasmic vacuole เท่ากับ  $50 \pm 3.54$  และ  $43 \pm 2.74$  เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างทั้งสองกลุ่มพบว่ามีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ขณะที่ร้อยละของ COCs ที่เกิด cytoplasmic vacuole ในกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ ที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV มีค่าเท่ากับ  $34 \pm 4.18$  และ  $42 \pm 2.74$  เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างทั้งสองกลุ่มพบว่ามีค่าแตกต่างกัน และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 โมลาร์ทั้งที่ไม่แช่แข็งและแช่แข็งพบว่ามีค่าแตกต่างกัน และการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 3 โมลาร์ ทั้งที่ไม่แช่แข็งและแช่แข็งพบว่าไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 5



ภาพที่ 22 ร้อยละของ COCs ที่มี cumulus cell ลอกหลุด

### ผลของการแช่แข็งต่อร้อยละของ cumulus-oocyte complexes ที่มีโครงสร้างที่ผิดปกติของ cumulus cell

ร้อยละของ COCs ที่มีความผิดปกติของ cumulus cell ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ  $16 \pm 2.24$  เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของ EG ที่มีต่อร้อยละของ COCs ที่มีความเสียหายของ cumulus cell พบว่าในกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ โดยไม่ผ่านการแช่แข็งที่มีค่าร้อยละความเสียหายของ cumulus cell เท่ากับ  $78 \pm 2.74$  และ  $72 \pm 2.74$  เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างทั้งสองกลุ่มพบว่ามี ความแตกต่างกันทางสถิติ และร้อยละของ COCs ที่มีความเสียหายต่อ cumulus cell ในกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ ที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV มีค่าเท่ากับ  $72 \pm 2.74$  และ  $78 \pm 2.74$  เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างทั้งสองกลุ่มพบว่ามี ความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ทั้งที่ไม่แช่แข็งและแช่แข็งพบว่ามี ความแตกต่างกัน และการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 3 โมลาร์ ทั้งที่ไม่แช่แข็ง และแช่แข็งพบว่ามี ความแตกต่างกันทางสถิติเช่นเดียวกัน ดังตารางที่ 5



ภาพที่ 23 ร้อยละของ COCs ที่ ZP ที่ฉีกขาด

### ผลของการแช่แข็งต่อร้อยละของ cumulus-oocyte complexes ที่มีโครงสร้างที่ผิดปกติของ zona pellucida

ร้อยละของ COCs ที่มีความผิดปกติของ ZP ในกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับ  $17 \pm 2.74$  เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ พบว่าไม่แตกต่างกันในทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งโดยใช้สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 3 โมลาร์ พบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ร้อยละของ COCs ที่มีความเสียหายของ ZP พบว่าในกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ โดยไม่ผ่านการแช่แข็งที่มีค่าร้อยละความเสียหายต่อ ZP เท่ากับ  $27 \pm 2.74$  เปอร์เซ็นต์เท่ากันทั้งสองกลุ่ม เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างทั้งสองกลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน และร้อยละของ COCs ที่มีความเสียหายต่อ ZP ในกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ ที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV มีค่าเท่ากับ  $28 \pm 2.74$  และ  $40 \pm 3.56$  เปอร์เซ็นต์ การเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างทั้งกลุ่มพบว่ามีค่าความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 โมลาร์ทั้งที่ไม่แช่แข็งและแช่แข็งพบว่าไม่แตกต่างกัน และการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่แช่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 3 โมลาร์ ทั้งที่ไม่แช่แข็งและแช่แข็งพบว่ามีค่าความแตกต่างกันทางสถิติ ดังตารางที่ 5

## ลักษณะโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของ Cumulus-oocytes complex (COCs) โดยการศึกษาจากวิธี Lectin Histochemistry

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของ COCs โดยวิธี Lectin Histochemistry โดยใช้  
เลคติน 6 ชนิด เพื่อตรวจดูโครงสร้างของ COCs พบว่าเลคตินแต่ละชนิดสามารถจับบริเวณ  
โครงสร้างของโอโอไซต์ได้ 3 ส่วนคือ cumulus cell, ZP และ oolemma ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่าง  
กันออกไปดังนี้

การติดของ lectin PSA และ GSL II พบติดที่บริเวณ โครงสร้างที่ ZP และ cumulus cell ใน  
กลุ่มควบคุมโดยมีระดับการติดสีที่อ่อน และ lectin VVA พบติดที่บริเวณ โครงสร้างที่ oolemma, ZP  
และ cumulus cell ในกลุ่มควบคุมโดยมีระดับการติดสีที่อ่อน

การติดสีของ lectin ECL พบติดที่บริเวณ โครงสร้างทั้ง 3 ส่วนในกลุ่มควบคุมและกลุ่มแซ่  
สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 โมลาร์ โดยติดสีปานกลาง แต่ในกลุ่มแซ่สารป้องกันการแช่  
แข็ง EG เข้มข้น 3 โมลาร์ และ กลุ่มที่แซ่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ และ  
ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV ติดสีอ่อน

การติดสีของ lectin LEL พบติดที่บริเวณ โครงสร้าง 2 ส่วนคือ ZP และ cumulus cell ใน  
กลุ่มควบคุมติดสีเข้มและกลุ่มแซ่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ ทั้งที่ไม่ผ่าน  
การแช่แข็งและผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV ติดสีปานกลาง

การติดสีของ lectin s-WGA พบติดที่บริเวณ โครงสร้าง 2 ส่วนคือ ZP และ cumulus cell ใน  
กลุ่มควบคุมและกลุ่มแซ่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ติดสีปานกลาง

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การแช่แข็งโดยวิธี SSV มีผลต่อความเสียหายของน้ำตาล  $\alpha$  and  $\beta$ -N-  
acetyl glucosamine และ  $\beta$ -D-N-acetylgalactosamine ที่อยู่บน ZP และ cumulus cell ของโอโอไซต์  
และ PSA พบว่าโอโอไซต์ในกลุ่มการทดลองที่แซ่สารป้องกันการแช่แข็ง EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โม  
ลาร์ ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งและผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV ไม่ติด PSA จะติดเฉพาะแต่ในกลุ่ม  
ควบคุมโดยติดสีอ่อน จากผลการทดลองนี้พบว่า สารป้องกันการแช่แข็งและการแช่แข็งโดยวิธี SSV  
มีผลต่อความเสียหายของน้ำตาล  $\alpha$ -mannose ที่อยู่บน ZP และ cumulus cell ของโอโอไซต์ และมี

ผลต่อความเสียหายของน้ำตาล  $\beta$ -D-N-acetylgalactosamine และ  $\beta$ -D-galactose (1,4) N-acetylgalactosamineoolemma (ดังตารางที่ 7,8 และ 9; ภาพที่ 24-35)



ตารางที่ 7 แสดงผลการติดของ Lectin บน zona pellucida ของโอโอไซต์สุนัข

กลุ่ม	ชนิดของโอโอไซต์	PSA	s-WGA	GSL II	ECL	LEL	VVA
1	โอโอไซต์ชนิดสด	+	++	+	++	+++	+
2	โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M)	-	++	-	++	++	-
3	โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M)	-	++	-	+	++	-
4	โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification	-	-	-	+	++	-
5	โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification	-	-	-	+	++	-

หมายเหตุ: (+) และ (-) แสดงถึงความสามารถในการติดสีในระดับต่างๆ: (-) ไม่ติด lectin; (+) ติด lectin อ่อน; (++) ติด lectin ปานกลาง; (+++) ติด lectin เข้ม

ตารางที่ 8 แสดงผลการติดของ lectin บน cumulus cell ของโอโอไซตส์สุนัข

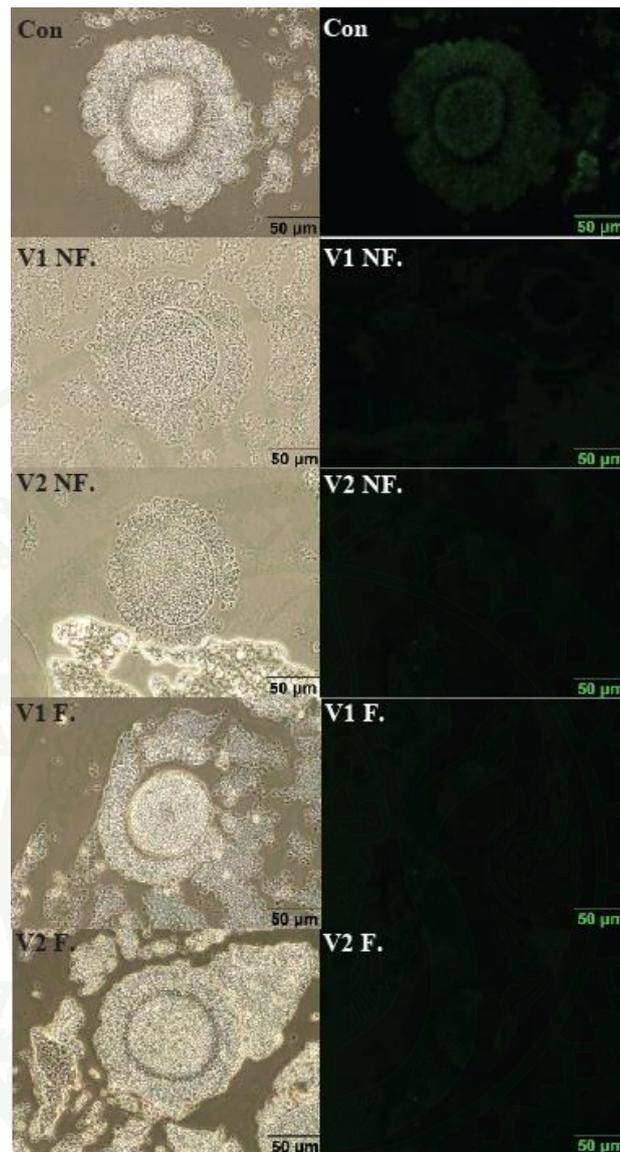
กลุ่ม	ชนิดของโอโอไซตส์	PSA	s-WGA	GSL II	ECL	LEL	VVA
1	โอโอไซตส์ชนิดสด	++	++	+	++	+++	+
2	โอโอไซตส์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M)	-	++	-	++	++	-
3	โอโอไซตส์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M)	-	++	-	+	++	-
4	โอโอไซตส์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification	-	-	-	+	++	-
5	โอโอไซตส์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification	-	-	-	+	++	-

หมายเหตุ: (+) และ (-) แสดงถึงความสามารถในการติดสีในระดับต่างๆ: (-), ไม่ติด lectin; (+), ติด lectin อ่อน; (++) , ติด lectin ปานกลาง; (+++), ติด lectin เข้ม

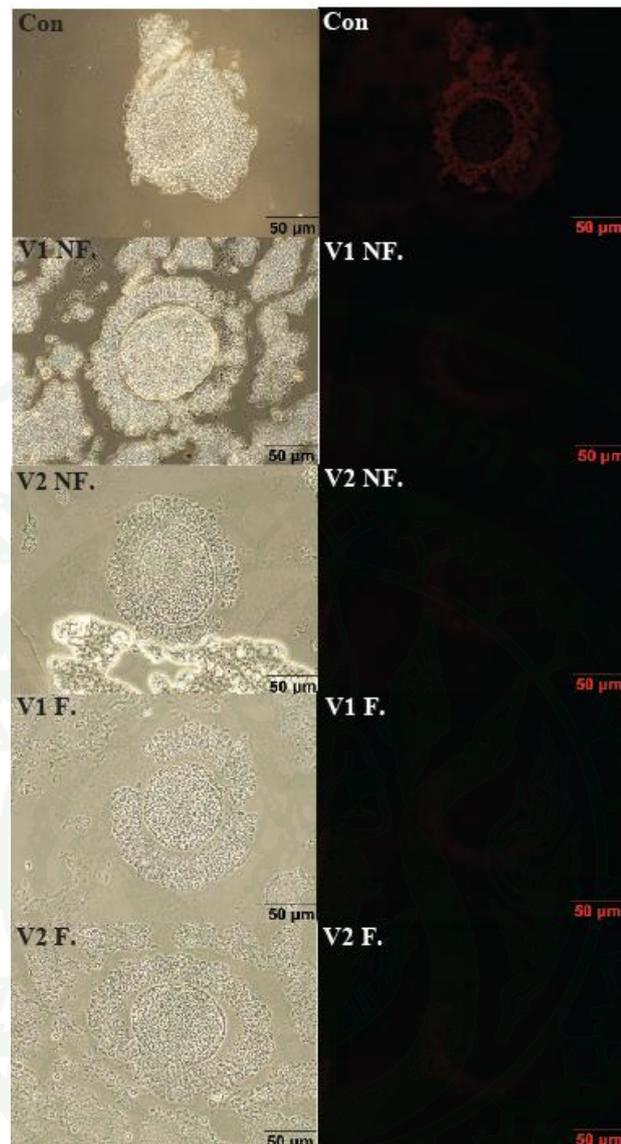
ตารางที่ 9 แสดงผลการติดของ lectin บน oolemma ของโอโอไซต์สุนัข

กลุ่ม	ชนิดของโอโอไซต์	PSA	s-WGA	GSL II	ECL	LEL	VVA
1	โอโอไซต์ชนิดสด	-	-	-	++	-	+
2	โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M)	-	-	-	++	-	-
3	โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M)	-	-	-	+	-	-
4	โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification	-	-	-	+	-	-
5	โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification	-	-	-	+	-	-

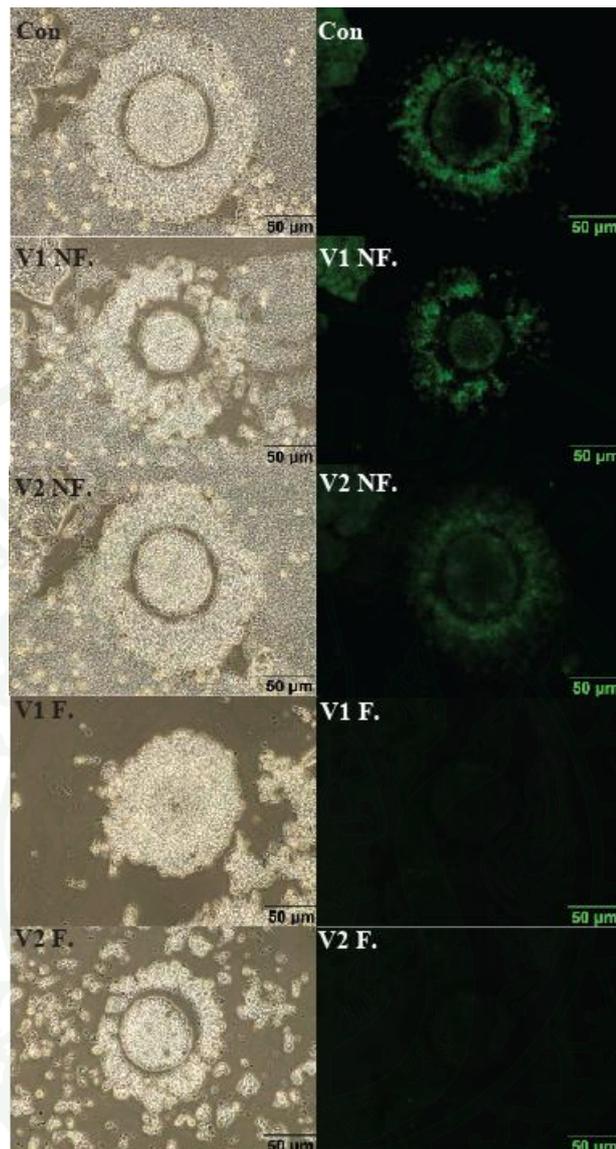
หมายเหตุ: (+) และ (-) แสดงถึงความสามารถในการติดสีในระดับต่างๆ: (-), ไม่ติด lectin; (+), ติด lectin อ่อน; (++) , ติด lectin ปานกลาง; (+++), ติด lectin เข้ม



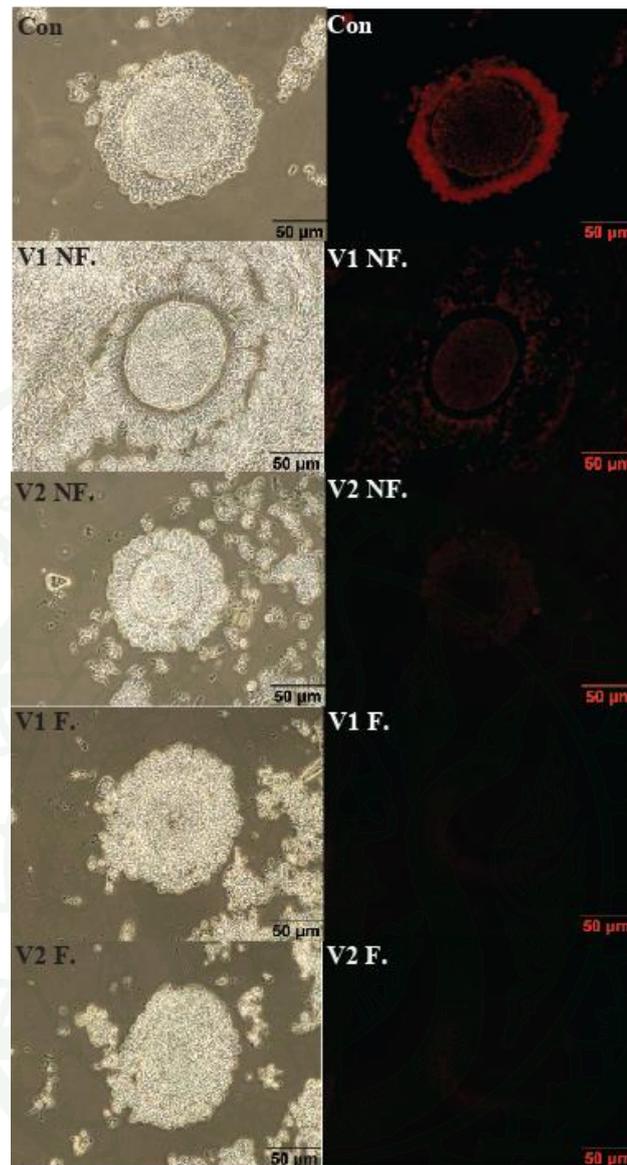
**ภาพที่ 24** ภาพถ่ายจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์แสดงลักษณะของโอโอไซต์ใน ที่ย้อมด้วย Lectin PSA ที่ติดจลาทด้วย Fluorescein Avidin D; con, กลุ่มควบคุม; V1 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M); V2 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) V1 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M)และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification; V2 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M)และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification



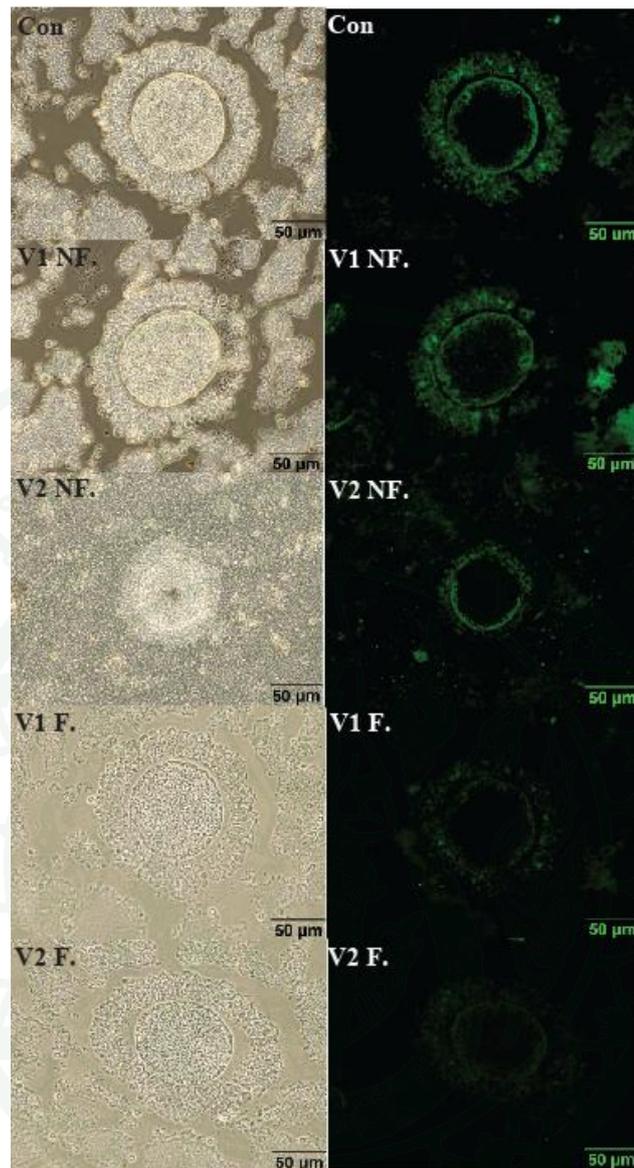
ภาพที่ 25 ภาพถ่ายจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์แสดงลักษณะของโอโอไซต์ใน ที่ย้อมด้วย Lectin PSA ที่ติดฉลากด้วย Rhodamine Avidin D; con, กลุ่มควบคุม; V1 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M); V2 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) V1 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M)และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification; V2 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M)และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification



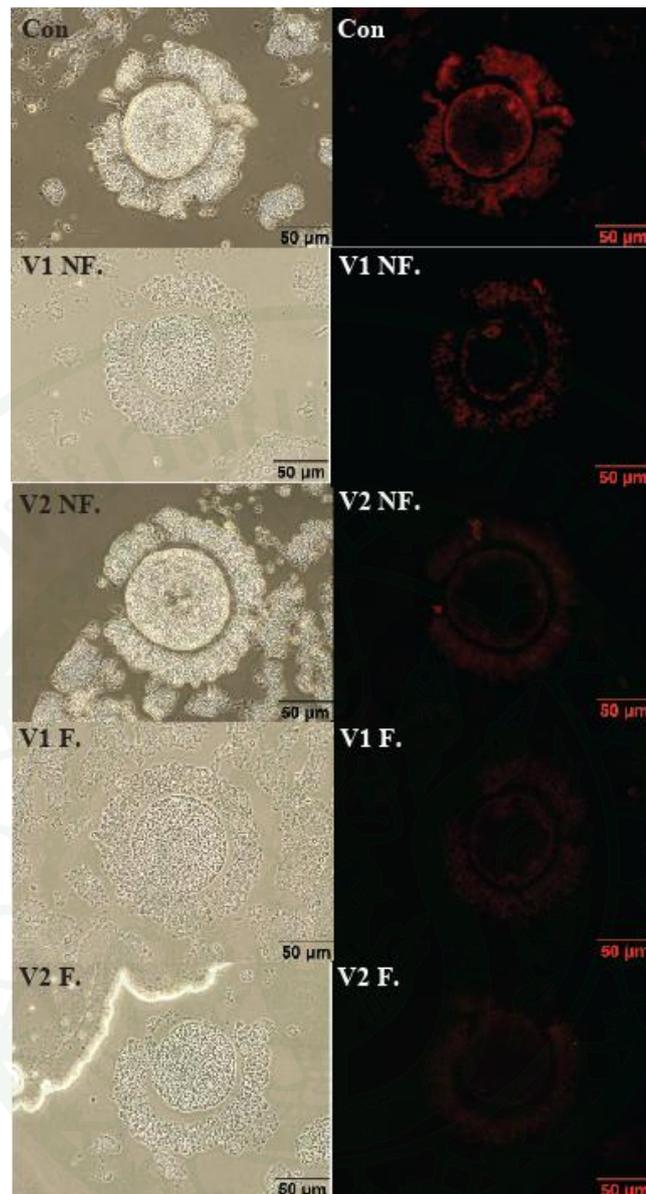
ภาพที่ 26 ภาพถ่ายจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์แสดงลักษณะของโอโอไซต์ ที่ย้อมด้วย Lectin s-WGA ที่ติดฉลากด้วย Fluorescein Avidin D; con, กลุ่มควบคุม; V1 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M); V2 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) V1 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M)และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification; V2 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M)และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification



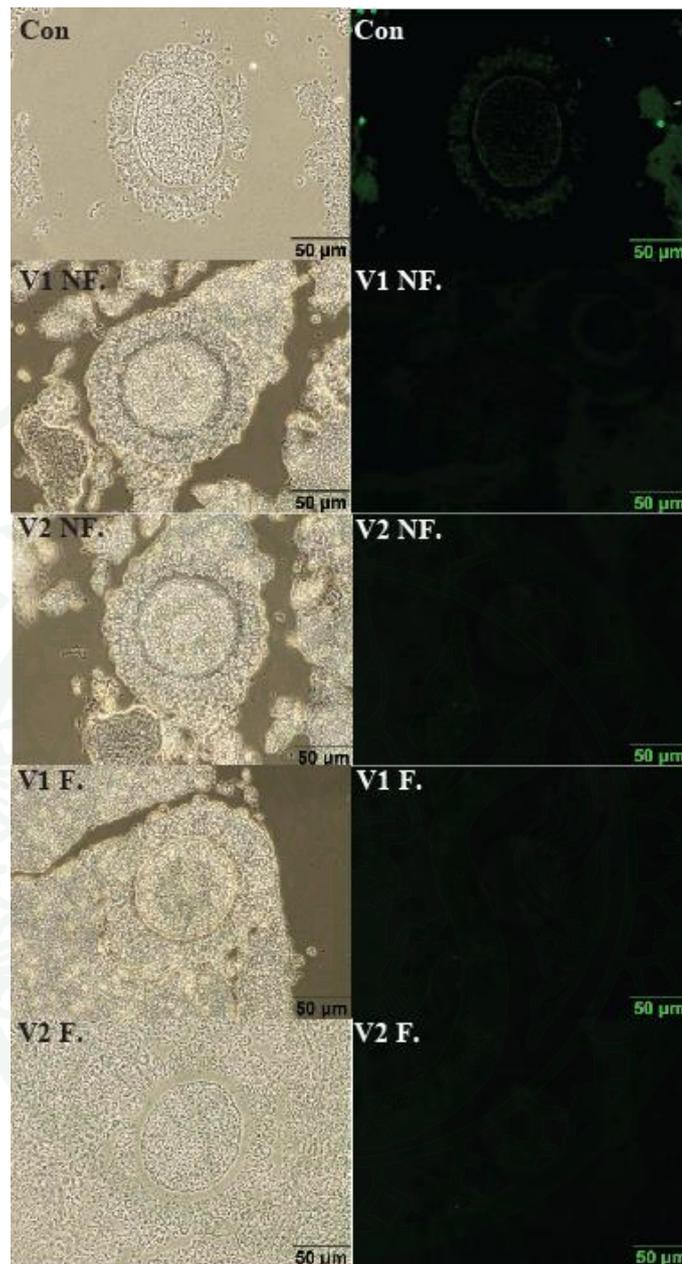
ภาพที่ 27 ภาพถ่ายจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์แสดงลักษณะของโอโอไซต์ ที่ย้อมด้วย Lectin s-WGA ที่ติดฉลากด้วย Rhodamine Avidin D; con, กลุ่มควบคุม; V1 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M); V2 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) V1 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M)และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification; V2 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M)และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification



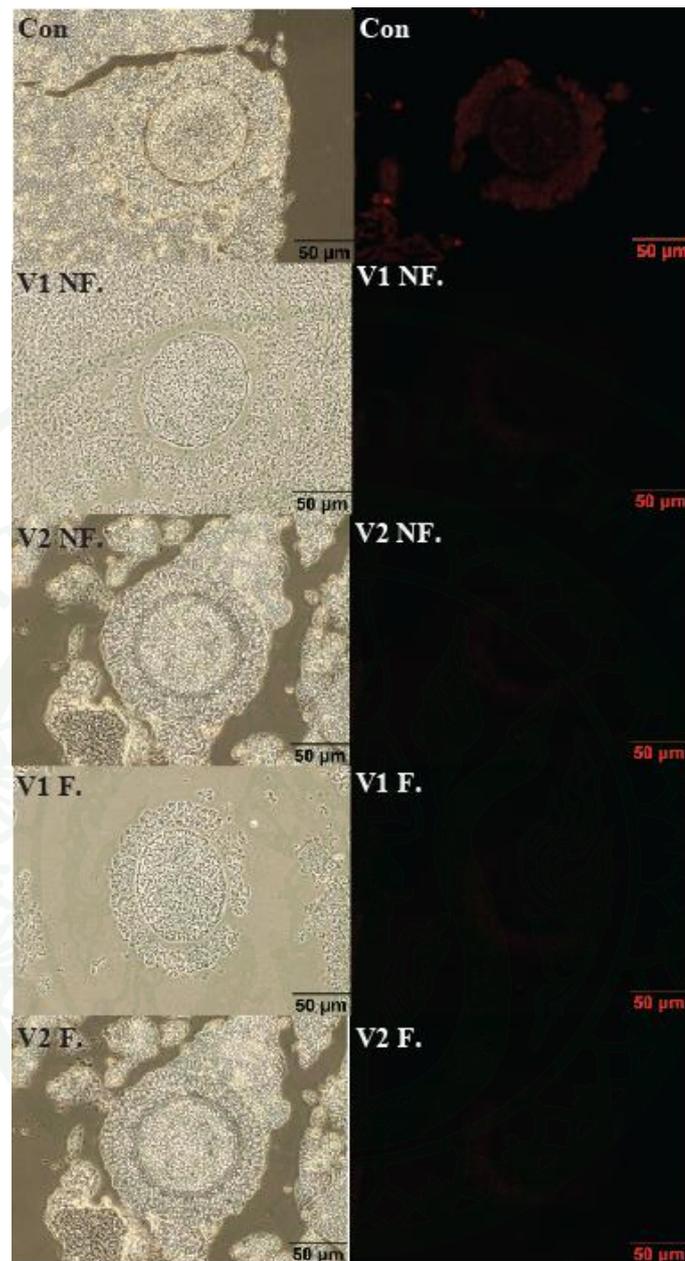
**ภาพที่ 28** ภาพถ่ายจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์แสดงลักษณะของโอโอไซต์ ที่ย้อมด้วย Lectin ECL ที่ติดฉลากด้วย Fluorescein Avidin D; con, กลุ่มควบคุม; V1 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M); V2 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M); V1 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M)และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification; V2 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M)และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification



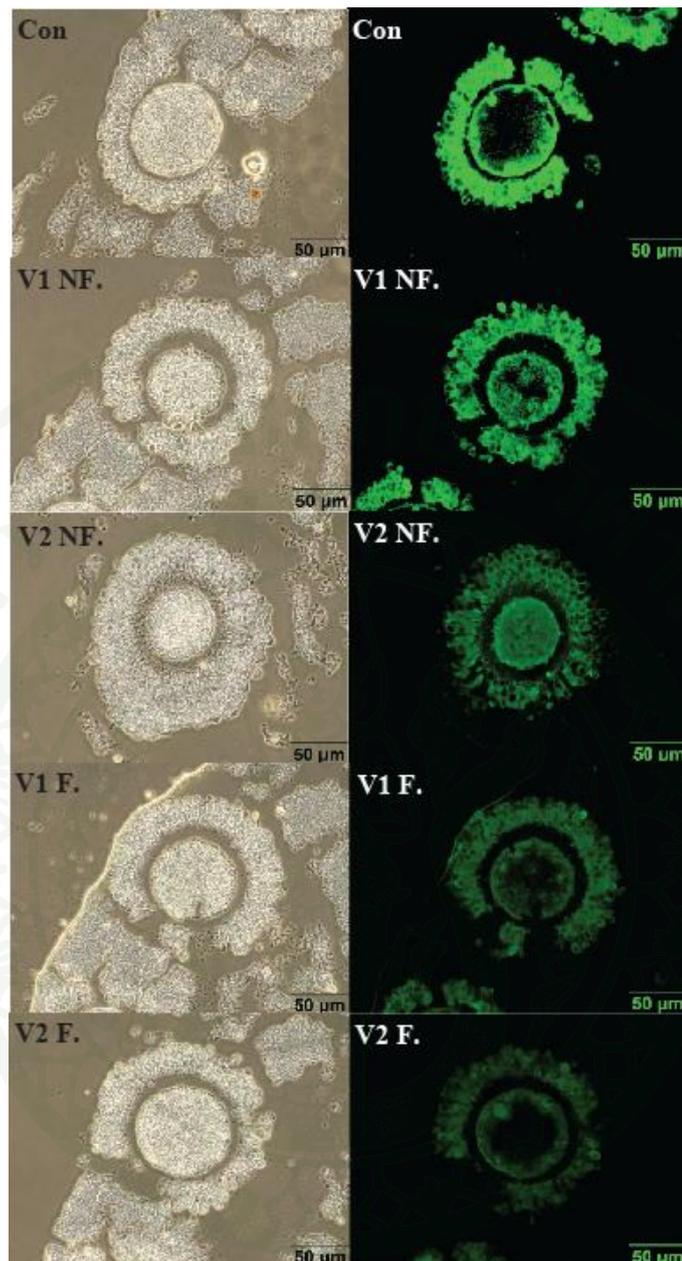
**ภาพที่ 29** ภาพถ่ายจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์แสดงลักษณะของโอโอไซต์ ที่ย้อมด้วย Lectin ECL ที่ติดฉลากด้วย Rhodamine Avidin D; con, กลุ่มควบคุม; V1 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M); V2 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M); V1 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification; V2 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification



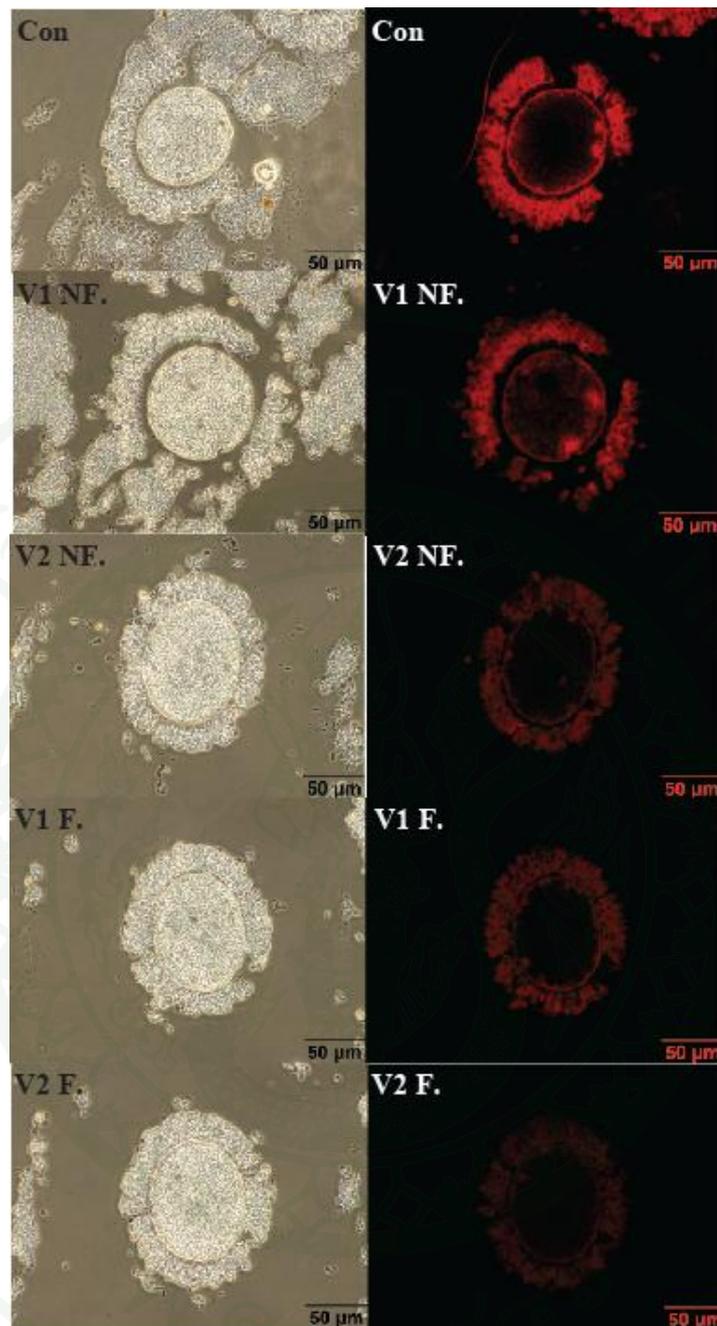
**ภาพที่ 30** ภาพถ่ายจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์แสดงลักษณะของโอโอไซต์ ที่ย้อมด้วย Lectin GSL II ที่ติดฉลากด้วย Fluorescein Avidin D; con, กลุ่มควบคุม; V1 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M); V2 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) V1 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification; V2 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification



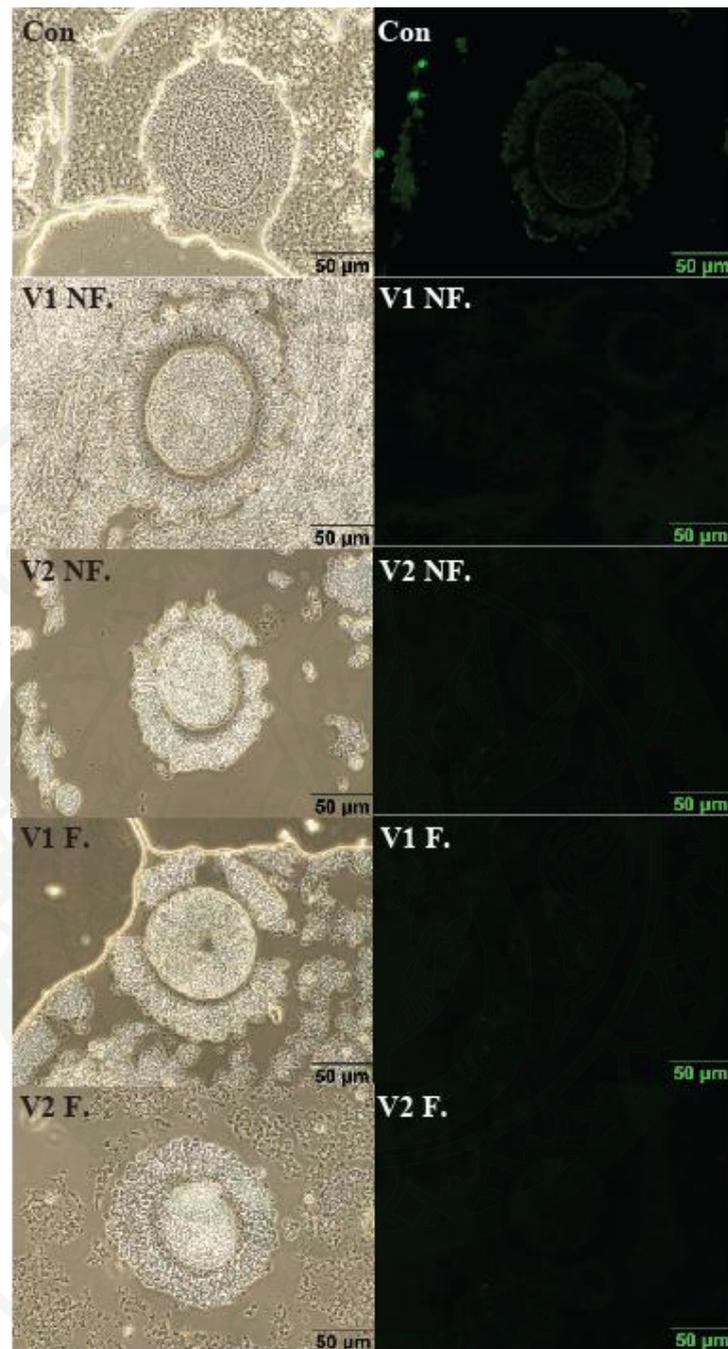
**ภาพที่ 31** ภาพถ่ายจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์แสดงลักษณะของโอโอไซต์ ที่ย้อมด้วย Lectin GSL II ที่ติดฉลากด้วย Rhodamine Avidin D; con, กลุ่มควบคุม; V1 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M); V2 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) V1 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification; V2 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification



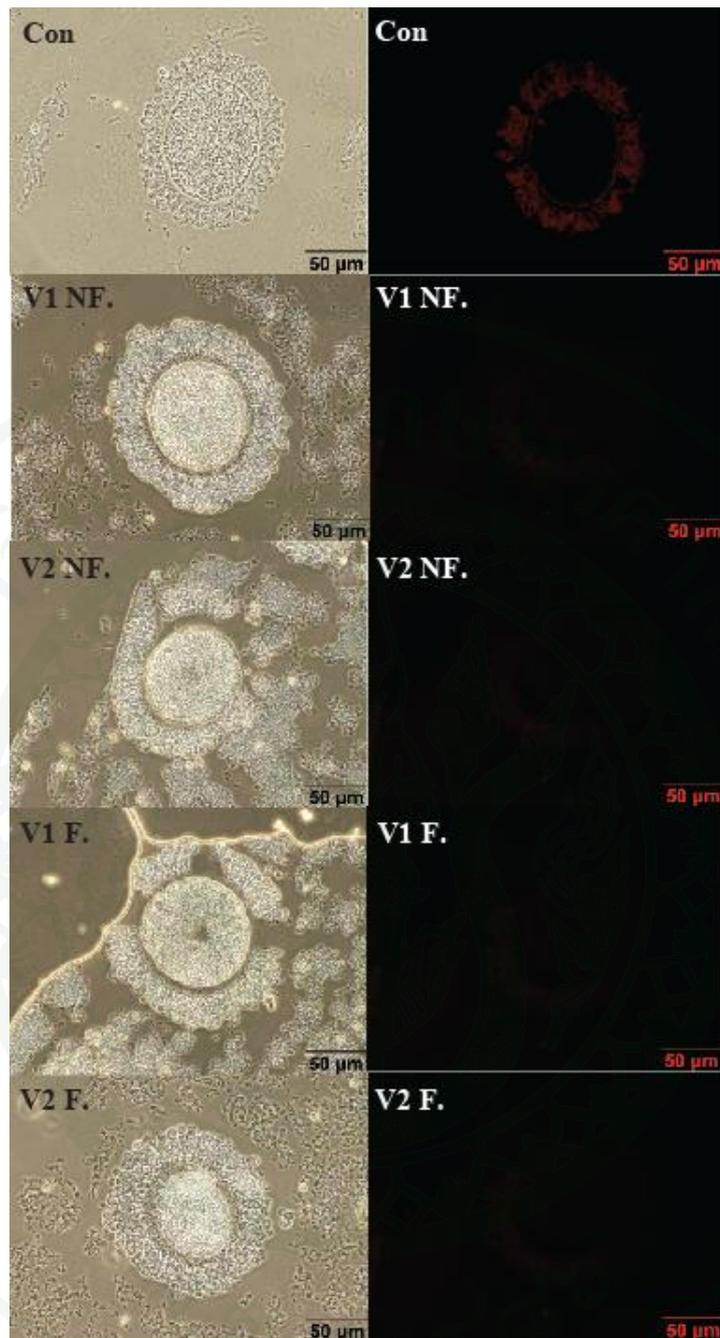
**ภาพที่ 32** ภาพถ่ายจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์แสดงลักษณะของโอโอไซต์ ที่ย้อมด้วย Lectin LEL ที่ติดผลากด้วย Fluorescein Avidin D con, กลุ่มควบคุม; V1 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M); V2 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M); V1 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M)และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification; V2 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M)และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification



ภาพที่ 33 ภาพถ่ายจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์แสดงลักษณะของโอโอไซต์ ที่ย้อมด้วย Lectin LEL ที่ติดฉลากด้วย Rhodamine Avidin D con, กลุ่มควบคุม; V1N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M); V2 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M); V1 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification; V2 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification



ภาพที่ 34 ภาพถ่ายจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์แสดงลักษณะของโอโอไซต์ ที่ย้อมด้วย Lectin VVA ที่ติดฉลากด้วย Fluorescein Avidin D con, กลุ่มควบคุม; V1 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M); V2 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M); V1 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification; V2 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification



ภาพที่ 35 ภาพถ่ายจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์แสดงลักษณะของโอโอไซต์ ที่ย้อมด้วย Lectin VVA ที่ติดฉลากด้วย Rhodamine Avidin D; con, กลุ่มควบคุม; V1 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M); V2 N.F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M); V1 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 1.5 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification; V2 F., โอโอไซต์ชนิดแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (ethylene glycol 3 M) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification

## วิจารณ์

จากการรายงานที่ผ่าน การเก็บรักษาโอโอไข่โดยวิธีวิทริฟิเคชันในโอโอไข่ของมนุษย์ และโอโอไข่ของสัตว์ พบว่าประสบความสำเร็จ ดังได้มีการรายงานความสำเร็จในการใช้วิธีวิทริฟิเคชันในการแช่แข็งโอโอไข่ของมนุษย์ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1999 โดย Kuleshova และคณะ จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บรักษาโอโอไข่ให้มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงและคงคุณภาพของโอโอไข่ และพบว่าวิธีวิทริฟิเคชันเป็นวิธีการที่พบว่าทำให้มีอัตราการรอดชีวิตของโอโอไข่ที่สูงที่สุดจากการรายงานของ Begin และคณะ (2003) พบว่าอัตราการรอดชีวิตของโอโอไข่แช่แข็งสูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ จึงได้มีการนำวิธีการ SSV มาใช้เก็บรักษาโอโอไข่ในสัตว์หลายชนิดรวมทั้งโอโอไข่สุนัข

จากการศึกษาความแตกต่างของร้อยละการรอดชีวิตของโอโอไข่สุนัขระหว่างกลุ่มการทดลองกับกลุ่มควบคุม พบว่าทั้งสารป้องกันการแช่แข็งและวิธีวิทริฟิเคชันเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อร้อยละการรอดชีวิตของโอโอไข่ และจากการรายงานของ Dinnyes และคณะ (2000) พบว่าวิธีการ SSV เป็นวิธีการที่มีร้อยละการรอดชีวิตของโอโอไข่มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะเป็วิธีการที่ลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว และต้องใช้สารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อโอโอไข่ได้ จากผลการทดลองที่ใช้การแช่แข็งวิธีนี้กับโอโอไข่ของสุนัขที่พบว่าร้อยละการรอดชีวิตของโอโอไข่ที่ไม่แตกต่างกันของกลุ่มการทดลองที่ไม่ผ่านการแช่แข็งและผ่านการแช่แข็งนั้น และอัตราการรอดชีวิตของกลุ่มที่ได้รับสารป้องกันการแช่แข็งและผ่านการแช่แข็งอยู่ในอัตราค่อนข้างสูง (72.13-74.40 เปอร์เซ็นต์) ร้อยละการรอดชีวิตในการศึกษานี้พบว่ามีค่าสูงกว่าผลของการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ที่รายงานในสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น กระบือ (Sharma & Purohit 2008), มนุษย์ (Selman *et al.*, 2006), สุนัข (Shi *et al.*, 2007), และสุนัข (Turathum *et al.*, 2010) ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากการที่ใช้อุปกรณ์ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจากการทดสอบเปรียบเทียบการแช่แข็งแบบ vitrification ที่ใช้ SSV และ cryoloop ในการแช่แข็งโอโอไข่ของแพะกลับไม่แตกต่างกัน (Dinnyes *et al.*, 2000) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าโอโอไข่ของสุนัขสามารถทนทานต่อการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ได้ดีกว่าโอโอไข่ของสัตว์ชนิดอื่นและการใช้ EG ร่วมกับ ทริฮาโลสเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิต

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ EG ที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการตายของ โอโอไรต์ของสุนัข EG เป็นสารป้องกันการแช่แข็งชนิดซึมผ่านเข้าเซลล์ สามารถเข้าไปแทนที่น้ำในเซลล์ เพื่อช่วยลดการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของเซลล์อย่างกะทันหันและช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง และทริฮาโลส เป็นสารป้องกันการแช่แข็งชนิดไม่ซึมผ่านมีบทบาทหน้าที่สำคัญต่อร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ระหว่างการละลาย และผลจากการนำสารป้องกันการแช่แข็งชนิดซึมผ่านเซลล์และชนิดไม่ซึมผ่านเซลล์มาใช้ร่วมกันทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งได้ดีขึ้นทั้งภายนอกและภายในเซลล์ (Jain and Paulson., 2006) EG ยังมีความเป็นพิษต่ำเมื่อเทียบกับสารชนิดอื่น จึงเป็นสารที่เหมาะสมในการใช้เก็บรักษาโอโอไรต์

การแช่แข็งแบบ vitrification มีลักษณะสำคัญคือโอโอไรต์สัมผัสกับสารแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงในเวลาอันสั้น ทำให้อัตราการแช่แข็งเป็นไปอย่างรวดเร็วยิ่งยวด ความเข้มข้นของ EG ที่นิยมใช้ คือ 3 โมลาร์ (Ali and Shelton. 1993) ทั้งนี้อัตราการแพร่ของสารและน้ำในไซโตพลาสซึมขึ้นกับความเข้มข้นของ EG ซึ่งมีความสัมพันธ์กับเวลาที่ใช้ในการ equilibration และการบ่มใน vitrification medium (Leibo and Pool, 2011) การที่มีปริมาณ EG ในไซโตพลาสซึมที่เหมาะสมจะป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์และลดอัตราการตายของโอโอไรต์ที่ถูกทำลาย การใช้ EG เข้มข้น 1.5 และ 3 โมลาร์ในการแช่แข็งโอโอไรต์ของสุนัขแบบ SSV ให้ผลดีในระดับเดียวกัน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการใช้ EG ที่ความเข้มข้นต่างๆในการแช่แข็งแบบ SSV ของโอโอไรต์ของสุกรที่แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ EG ไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของโอโอไรต์ (Hettig *et al.*, 2011)

ผลของเวลาที่ใช้ในการทดสอบในแต่ละกลุ่มการทดลองอาจมีผลต่อการรอดชีวิตหรือการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างCOC ในกลุ่มการทดลองที่ 2 และ 3 มีขั้นตอนการทดสอบน้อยกว่ากลุ่มที่มีการแช่แข็ง (กลุ่มที่ 4 และ 5) และใช้เวลาน้อยกว่าซึ่งอาจมีผลต่อการรอดชีวิต แต่ผลการทดลอง (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นว่าปัจจัยเรื่องเวลาในการทดสอบไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิต แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงปัจจัยเรื่องเวลาที่มีผลโดยตรงต่อการรอดของโอโอไรต์ในการแช่แข็ง

การประเมินคุณภาพของโอโอไซต์โดยการตรวจจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับวิธีการเก็บรักษาโอโอไซต์เพื่อแสดงให้เห็นถึงความเสียหายของโครงสร้างโอโอไซต์ซึ่งมักจะเกิดผลมาจากการเก็บรักษาที่เกี่ยวข้องกับวิธีการและชนิดของสารป้องกันการแช่แข็งที่ใช้ (Coticchio *et al.*, 2010) จากการศึกษาความเสียหายของโครงสร้างของโอโอไซต์ระหว่างกลุ่มการทดลองกับกลุ่มควบคุมพบว่าเกิดความแตกต่างของขนาดของโอโอไซต์และ ความหนาของ ZP มีขนาดที่เล็กลง การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเก็บรักษาโอโอไซต์ไว้ในสารละลายเกลือ พบว่า ZP บางลงหลังจากแช่โอโอไซต์ในสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นต่างๆ (Hammit *et al.*, 1993, Strom Holst *et al.*, 2000) สารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นสูง อาจไปมีผลทำให้เกิดการดึงน้ำออกมาจากภายในโอโอไซต์ และองค์ประกอบอื่นๆที่มีอยู่ในสารละลายเกลือจะไปลดความสามารถในการยึดหยุ่นของผนัง ZP (Chian *et al.*, 1991)

ความเสียหายที่พบใน COCs ของทุกกลุ่มการทดลอง ได้แก่ ZP มีลักษณะขาดแหวน cumulus cell หลุดกระจายออกจากโอโอไซต์ oolemma ฝักขาด พบการเกิด vacuole ภายในไซโตพลาสซึม ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับโอโอไซต์ของสุกรหลังผ่านการแช่แข็งที่มีความผิดปกติที่สำคัญซึ่งเกิดขึ้นกับ โครงสร้างของเซลล์ (อดิสร และคณะ 2547) ความเสียหายของเซลล์ที่เกิดระหว่างกระบวนการแช่แข็ง มีสาเหตุจากการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ซึ่งเป็นผลมาจากการซึมผ่านของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งจนเกิดการอิมิตัว (Kuwayama *et al.*, 1999)

การหลุดลอกของ cumulus cell พบได้ในกลุ่มการทดลองที่สัมผัสกับสารป้องกันการแช่แข็งทั้งสองความเข้มข้น (EG 1.5 และ 3 โมลาร์) และผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV น่าจะเกิดจากปัจจัยทั้งสอง มีผลต่อความเสียหายของ junction ระหว่าง cumulus cell กับโอโอไซต์ (Hurtt *et al.*, 2000) เนื่องจาก cumulus cell มีบทบาทหน้าที่ในการเจริญเติบโตของโอโอไซต์ โดยมีหน้าที่ส่งสารอาหารไปสู่โอโอไซต์เพื่อเป็นปัจจัยในการพัฒนาการเจริญเติบโต และยังมีหน้าที่ในการทำให้เกิดขบวนการ meiosis (Warriach and Chohan, 2004, Tanghe *et al.*, 2002, Downs, 2001)

oolemma ได้รับความเสียหายได้จากการแช่สารป้องกันการแช่แข็ง (EG 1.5 และ 3 โมลาร์) และการผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV ที่สอดคล้องกับการแช่แข็งของโอโอไซต์สุกร ที่พบว่า plasma membrane ของโอโอไซต์สุกรมีความไวต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงและมักได้รับความเสียหายจากการแช่แข็ง (Didion *et al.*, 1990)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโอโอไซต์พบว่าสามารถบอกได้ถึงความเสี่ยงของโครงสร้างของโอโอไซต์เท่านั้น ดังนั้นเราจึงมีการศึกษาระดับโมเลกุลเพื่อตรวจสอบความเสี่ยงของโครงสร้างของโอโอไซต์ให้มากขึ้นโดยการศึกษาโดยวิธี lectin histochemistry ซึ่งเป็นวิธีการศึกษาโครงสร้างของไกลโคโปรตีนโดยใช้เลคติน ที่มีคุณสมบัติในการจับจำเพาะกับน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ (Spicer and Schulte, 1992)

การแสดงออกของกลุ่มน้ำตาลในโครงสร้างของ COCs ในกลุ่มควบคุมพบว่าการแสดงออกของหมู่ น้ำตาล  $\beta$ -D-galactose และ N-acetylgalactosamine ที่ตรวจสอบได้โดยการย้อมด้วย ECL และ LEL มีระดับการติดสีสอดคล้องกับที่รายงานไว้และพบว่ามีระดับการติดสีในระดับที่เข้มดั่งนั้นหมู่ น้ำตาลชนิดนี้จึงเป็นองค์ประกอบหลักของโครงสร้าง COCs หมู่ น้ำตาล  $\alpha$ - $\beta$  N-acetylgalactosamine ที่ตรวจสอบโดยการย้อมด้วย VVA พบว่ามีระดับการติดสีในระดับที่อ่อนมากที่ oolemma และ ZP ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจของเลคตินนี้ในรังไข่สุนัขของ (Blackmore *et al.*, 2004) การแสดงออกของน้ำตาล N-acetylglucosamine (ที่ตรวจสอบโดยเลคติน s-WGA)  $\alpha$ - $\beta$  -N-acetylglucosamine (ที่ตรวจสอบโดยเลคติน GSL II) และ  $\alpha$ -mannose (ที่ตรวจสอบโดยเลคติน PSA) ที่พบใน COCs การทดลองนี้มีระดับการแสดงออกของน้ำตาลที่ต่ำกว่าผลที่พบในการรายงานของ Blackmore และคณะ (2004) จึงเป็นไปได้ว่าความแตกต่างนี้เกิดจากระยะการพัฒนาของฟอลลิเคิลที่แตกต่างกัน กล่าวคือ COCs ในการทดลองครั้งนี้ได้มาจาก tertiary follicle ขณะที่ในรายงานดังกล่าวเป็นการตรวจสอบ COCs ใน secondary follicle

ผลของความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็ง (EG) และการแช่แข็งลดการจับกันระหว่างเลคตินกับหมู่ น้ำตาลส่วนใหญ่ที่พบบนโครงสร้างของ COCs ต่างๆ ได้แก่ cumulus cell, ZP และ oolemma ดังนั้น การจับกันระหว่างเลคติน ECL กับ  $\beta$ -D-galactose LEL กับ N-acetylgalactosamine s-WGA กับ N-acetylglucosamine GSL II กับ  $\alpha$ - $\beta$  -N-acetylglucosamine PSA กับ  $\alpha$ -mannose ขณะที่การจับกันระหว่าง VVA กับ  $\alpha$ - $\beta$  N-acetylgalactosamine ไม่ได้รับผลกระทบ

ความแตกต่างของความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็งทำให้เกิดความดันออสโมติกแตกต่างกันอาจมีผลทำลายโครงสร้างของ glycocalyx ซึ่งมีหมู่น้ำตาลเป็นส่วนประกอบและนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของหมู่น้ำตาลในโครงสร้างต่างๆ (Talaei *et al.*, 2010) สารป้องกันการแช่แข็ง EG ที่ใช้ในการแช่แข็งและการแช่แข็งมีผลต่อความเสียหายของพื้นผิวโมเลกุลของเซลล์ และอาจนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของน้ำตาลที่อยู่บนผิวของ ZP (Saunders and Parks, 1999) ซึ่งทำให้มีผลต่อการจับของเลคตินที่จำเพาะ จากการรายงานของ Lee และคณะในปี ค.ศ. 2006 พบว่าไอโอไซต์ของสุนัขไม่ทนต่ออุณหภูมิที่ต่ำลงอย่างรวดเร็วซึ่ง การแช่แข็งด้วยวิธีวิธีฟิสิกส์อาจส่งผลให้เซลล์เกิดความผิดปกติ และจะมีผลต่อกระบวนการ glycosylation (Oskar and Krishan, 2001) ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้โครงสร้างของน้ำตาลเปลี่ยนแปลงไป

จากผลการทดลองนี้กล่าวได้ว่า การใช้วิธี SSV ในการนำมาเก็บรักษาไอโอไซต์ของสุนัขที่อุณหภูมิต่ำโดยวิธีฟิสิกส์ ข้อดีคือลดปริมาณการสัมผัสสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งของไอโอไซต์เพื่อลดความเป็นพิษ และเพิ่มความเร็วในการแข็งตัวของเซลล์ให้เร็วยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ดี ยังพบว่าความเสียหายของลักษณะโครงสร้างของไอโอไซต์ ดังนั้นจึงต้องมีความจำเป็นต้องศึกษาค้นคว้าหาวิธีที่มีประสิทธิภาพเพื่อเพิ่มร้อยละการรอดชีวิตของไอโอไซต์และรักษาโครงสร้างของไอโอไซต์ตามความต้องการของการใช้เทคโนโลยีทางระบบสืบพันธุ์ในปัจจุบัน

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเก็บรักษาโอโอไซต์โดยวิธีวิธีฟิเกชั่น ผลของระดับความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็ง ethylene glycol และ การแช่แข็งที่มีต่อร้อยละของการรอดชีวิตของโอโอไซต์ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของ COCs และการจับของเลคตินที่มีต่อหน้มน้ำตาลที่ปรากฏบนของโครงสร้างของ COCs

### ข้อเสนอแนะ

หากจะมีการศึกษาต่อไปควรทดสอบการพัฒนาของโอโอไซต์ในกระบวนการเกิด nuclear maturation และ cytoplasmic maturation โดยวิธี in vitro maturation และทดสอบความสามารถในการปฏิสนธิของโอโอไซต์โดยวิธี in vitro fertilization

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เกษกนก ศิริณฤมิตร. 2548. **วิทยาระบบสืบพันธุ์สุนัขเพศเมีย**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ดวงใจ บุญกุศล. 2551. เทคโนโลยีชีวภาพการแช่แข็งเอ็มบริโอแบบวิทรีไฟเคชั่น. **วารสารวิทยาศาสตร์ มศว**. 24(2):137-154.

พีรศักดิ์ สุทธิโยธิน. 2549. **วิทยาการสืบพันธุ์สุนัข**. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

ไพศาล เทียนไทย และ ยาชูยูกิ อาเบะ. 2548. อัตราการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์สุกรภายหลังการแช่แข็งแบบวิทรีไฟเคชั่น ด้วยการปรับสมดุลแบบหลายชั้นในสารละลาย EFS และใช้ตาข่ายไนลอน. **สัตวแพทยสาร** 56: 1-10.

สหัส นุชนารถ. 2548. การศึกษาเปรียบเทียบผลของการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้าและแบบ Vitrification ต่อคุณภาพตัวอ่อน โคนมที่ตัดแบ่งเซลล์เพื่อคัดเพศด้วยเทคนิค PCR. **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต**, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สมชัย พงศ์จรธยากุล. 2525. **จุลกายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์ (ระบบอวัยวะต่างๆ)**. ครั้งที่ 1. โครงการตำราคณะสัตวแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อดิสร อดิเรถาวร. 2544. การเปรียบเทียบการใช้โอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งในการทดสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิสุกร. **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต**, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อร่าม โรจนสกุล, สมพร ชินสมบุญ. 2539. **การปฏิสนธินอกร่างกายทางคลินิก**. ครั้งที่ 1. บริษัทเขตโล่การพิมพ์, กรุงเทพฯ.

- Abe, Y., D-S. Lee, S-K Kim and H. Suzuki. 2008. Vitrification of canine oocyte. **Ova Res.** 25: 32 - 36.
- Ali J. and J. N. Shelton. 1993. Design vitrification solutions for the cryopreservation of embryo. **J. Reprod. Fertil.** 99: 471-477.
- Apimeteetumrong, M. 1996. **Effects of culture temperature, fetal calf serum, and CO<sub>2</sub> concentration on *in vitro* maturation in swamp buffalo oocytes.** Master Degree Thesis, Graduate School of King Mongkut University Technology Thonburi, Bangkok, 91.
- Ball, GD., ME. Bellin, RL. Ax and NL. First. 1992. Glycosaminoglycans in bovine cumulus - oocyte complexes: Morphology and chemistry. **Mol. Cell Endocrin** 28: 113 - 122.
- Bagis H., H. O. Mercan, S. Cetin, and S. Sekmen. 2005. The effect of equilibration time on survival and development rates of mouse pronuclear-stage embryos vitrified in solid surface (SSV) and conventional straws: *in vitro* and *in vivo* evaluations. **Mol. Reprod. Dev.** 72: 494 - 501.
- Begin, I., B. Bhatia, H. Baldassarre, A. Dinnyes and C. L. Keefer. 2003. Cryopreservation of goat oocytes and *in vivo* derived 2-to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid - surface vitrification (SSV) methods. **Theriogenology.** 59: 1839 - 1850.
- Bopp B.L. and D.B. Seifer. 2008. **Age and Reproduction.** Midwest reproductive medicine, Indianapolis, Indiana
- Blackmore, D.G., L.R. Baillie, J.E. Holt, L. Dierkx, R. John Aitken and E.A. McLaughlin. 2004. Biosynthesis of the canine zona pellucida requires the integrated participation of both oocyte and granulose cells. **Bio. Reprod.** 71: 661 - 668.

Chian, RC., K. Niwa and K. Okuda. 2005. *In vitro* penetration of zona pellucida of salt-stored bovine oocytes before and after maturation by frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**. 36: 209 - 219.

Coticchio, G., A. Borini, V. Distratis, M. Maione, G. Scaravelli, V. Bianchi, G. Macchiarelli, S. A. Nottola. 2010. Qualitative and morphometric analysis of the ultrastructure of human oocytes cryopreserved by two alternative slow cooling protocols. **J. Assist Reprod. Genet.** 27: 131 - 140.

Concannon, P.W. 1991. Reproduction in the dog and cat. In: Cupps. P.T. (Ed). **Reproduction in the Domestic Animal**. 4th Edition. Academic Press, Inc. California. U.S.A. 517 - 535.

Cupps, P.T., 1987. **Reproduction in domestic animals**. Academic Press, Inc., San Diego, California.

Dean, J. 2002. Oocyte-specific genes regulate follicle formation, fertility and early mouse development. **J. Reprod. Immunol.** 53: 171 - 180.

Didion, BA. D. Pomp, MJ. Martin, GE. Homaniacs and CL. Markert. 1990. Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. **J. Anim. Sci.** 68: 2803 - 2810.

Dinnyes, A., Y. Dai, S. Jiang and X. Yang. 2000. High development rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation *in vitro* fertilization and somatic nucleartransfer. **Biol. Reprod.** 63: 513 - 518.

Downs, SM. 2001. A gap-junction-mediated signal, rather than an external paracrine factor, predominates during meiotic induction in isolated mouse oocytes. **Zygote** 9: 71 - 82.

- Eppig, J.J. 1992. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. **Dev. Biol.** 89: 268 - 272.
- Fissore, R.A., C.L. He and Vande Woude G.F. 1996. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocyte. **Biol. Reprod.** 55: 1261 - 1270.
- Frankfurt O.S. and A. Krishan. 2001. Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin. **J. Histochem. Cytochem.** 49: 369 - 378.
- Furger, C., C=L. Cronier, C. Poirot and M. Pouchelet. 1996. Human granulosa cell in culture exhibit functional cyclic AMP-regulated gap junction. **Mol. Hum. Reprod.** 2: 541 - 548.
- Funahashi, H., H. Ekwall and H. Rodriguez-Martinez. 2000. Zona reaction in porcine oocytes fertilized *in vivo* and *in vitro* as seen with scanning electron microscopy. **Biol. Reprod.** 63: 1437 - 1442.
- Fujihira, T., R., Kishida. and Y., Fukui. 2004. Developmental capacity of vitrified immature porcine oocyte following UICSI: effects of cytochalasin B and cryoprotectants. **Cryobiology.** 49: 286 - 290
- Ghetler, Y., E. Skutelsky, I. B. Num, L. B. Dor, D. Amihai and R. Shalgi. 2006. Human oocyte cryopreservation and the fate of cortical granules. **Fertil. Steril.** 86(1): 210 - 216.
- Gordon I.1994. **Storage and cryopreservation of oocytes and embryo**, In: laboratory production of cattle embryo. Biotechnology in Agriculture. No. 11. CAB International. Raven Press, Cambridge, UK, 293 - 328.
- Hanna, C., Ch. Long, K. Hinricgs, M. Westhusin and D. Kraemer. 2008. Assessment of canine oocyte viability after transportation and storage under different conditions. **Anim. Reprod. Sci.** 105: 451 - 456.

- Haenisch-Woehl, A., S. Kolle, C. Neumuller, F. Sinowatz and J. Braun. 2003. Morphology of canine cumulus-oocyte complexes in pre-pubertal bitches. **Anat. Histol. Embryol** 32: 373 - 377.
- Hammit, DG., CH. Syrop, DL. Walker, MR. Bennett. 1993. Conditions of oocyte storage and use of noninseminated as compared with inseminated, nonfertilized oocytes for the hemizona assay. **Fertil. Steril.** 60 (1): 131 - 6.
- Hewitt, D.A., P.F. Watson and G.C.W. England. 1998. Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology.** 49: 1083 - 1101.
- Hettig, A. V. Miclea, M. Zahan, I. Roman, Miclea, M. Botha, A. Rusa and F. Varo-Ghiuru. 2011. Vitrification of Immature swine oocyte by the SSV technique using different concentration of cryoprotector and exposure time. **Anim. Sci. Biotech.** 44 (1): 396-400.
- Hochi S., T. Fujimoto J. Braun and N. Oguri. 1994. Pregnaneies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. **Theriogenology** 42: 483 - 488.
- Hurt, A.E., F. Landim-Alvarenga, G.E. Seidel, Jr. and E.L. Squires. 2000. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pelled straws. **Theriogenology.** 54: 119 - 128.
- Jain J. K., M.D., and R.J. Paulson. 2006. Oocyte cryopreservation . **Fertil. Steril.** 86: 1037 - 1046
- Jovine, L., C. C. Darie, E.S. Litscher and P.M. Wassarman. 2005. Zona pellucida domain proteins. **Annu. Rev. Biochem.** 74: 83 - 114.

- Kuleshova, L., L. Gianaroli, C Magli., A. Ferraretti and A. Trounson. 1999. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. **Hum. Reprod.** 14: 3077 - 3079.
- Kupker, W., K. Diedrich, and R.G. Edwards. 1998. Principles of mammalian fertilization. **Hum. Reprod.** 13: 20 - 32.
- Kustritz, Root M. V. 2001. Use of Commercial Luteinizing Hormone and Progesterone Assay Kits in Canine Breeding Management. **Reprod. Dom. Anim.:** 291 - 296.
- Kuwayama, M., G. Vajta, O. Kato and S.P. Leibo. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Repro. Bio. Med. Online.** 11: 300 - 308.
- Lane, M., W.B. Schoolcraft and D.K. Gardner. 1999. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertil. Steril.** 72: 1073 - 1078.
- Lam, X., C. Gieseke, M. Knoll and P. Talbot. 2000. Assay and importance of adhesive interaction between hamster (*Mesocricetus auratus*) oocyte-cumulus-complexes and the oviductal epithelium. **Biol. Reprod.** 62: 579 - 588.
- Lee, H.S., X.J. Yin and I.K. Kong. 2007. Sensitivity of canine oocyte to temperature. **Theriogenology.** 66: 1468 - 1470.
- Leibo, S.P. and T.B. Pool. 2011. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes. **Fertil. Steril.** 96:269–76.
- Mahi-Brown CA. and R. Yanagimachi. 1983. Parameters influencing ovum pickup by the oviductal fimbria in the golden hamster. **Gamete Res.** 8: 1 - 10.

- Mahmoudzadeh, A.R., A. Van Soom, I. Van Vlaendren and A. De Kruif. 1993. A comparative study of the effect of one-step addition of different vitrification solutions on in vitro survival of vitrified bovine embryos. **Theriogenology**. 39: 1291 - 1302.
- Martino A., Songsasen N. and Leibo S.P. 1996. Development in to blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biol. Reprod.** 54: 1059 - 1069.
- Mattioli M. 1994. Transduction mechanisms for gonadotropin-induced oocyte maturation in mammals. **Zygote** 2: 347 - 349.
- Mazur P. 1980. Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities. **Orig. Life** 10: 137 - 59.
- Moor, R.M., M.W. Smith and R.M.C. Dawson. 1980. Measurement of intercellular coupling between oocyte and cumulus cell using intercellular markers. **Exp. Cell Res.** 126: 15 - 29.
- Mukaida T., Wada S., Takahashi K., Pedro P. B., An T. Z., and Kasai M. 1998. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8 cell mouse embryos. **Hum. Reprod.** 13: 2874 - 2879
- Oskar S. Frankfurt and A. Krishan. 2001. Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin. **J. Histochem. Cytochem.** 49(3): 369 - 378.
- Neeta, S. and M. Suneeta. 2009. Cryopreservation of Oocytes and Ovarian Tissue. **JK. Science.** 11: 2 - 5.
- Palasz, A. T. and R. J. Mapletoft. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnol. Adv.** 14: 127 - 49.

- Parillo, F., O. Fagioli, C.D. Aglio and A.Verini-supplizi. 2000. Lectin histochemical detection of sulfoglycans in the zona pellucida of mammalian antral oocyte. **Acta. Histochem.** 102: 193 - 202.
- Rho, G.J., S.N. Kim, J.G. Yoo, S. Balasubramanian, H.J. Lee and S.Y. Choe. 2002. Microtubule configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.** 63: 464 - 470.
- Rodrigues, A.P.R., C.A. Amorim, S.H.F. Costa, M.H.T. Matos, R.R. Santos, C.M. Lucci, S.N. Bao, O.M. Ohashi and J.R. Figueiredo. 2004. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. **Anim. Reprod. sci.** 84: 211 - 227.
- Rodrigues, B.A., A.E.F. Silva, P. Rodrigues, L.F. Cavalcante and J.L. Rodrigues. 2009. Cumulus cell featurea and chromatin configuration of *in vitro* matured canine COCs and the influence of *in vivo* serum progesterone concentrations of ovary donors. **Zygote** 17: 79 - 91.
- Saito, N. 1994. **Manual of embryo Transfer and in vitro fertilization in cattle.** National Livestock Breeding Center, MAFF, Japan, September, 132.
- Saunders K.M. and J.E. Parks. 1999. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocyte. **Biol. Reprod.** 61: 178 - 187.
- Selman, H. Antonio A., Nicoletta B., G. F. Brusco, A. Pacchiarotti and C. Aragona. 2006. Ongoing pregnancies after vitrification of human oocytes using a combined solution of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. **Fertil. Steril.** 86: 997 - 1000
- Shalgi, R.A., A. Matilvahu, L. Nobel. 1986. The role of carbohydrates in sperm-egg interaction in rats. **Biol. Reprod.** 34: 446 - 452

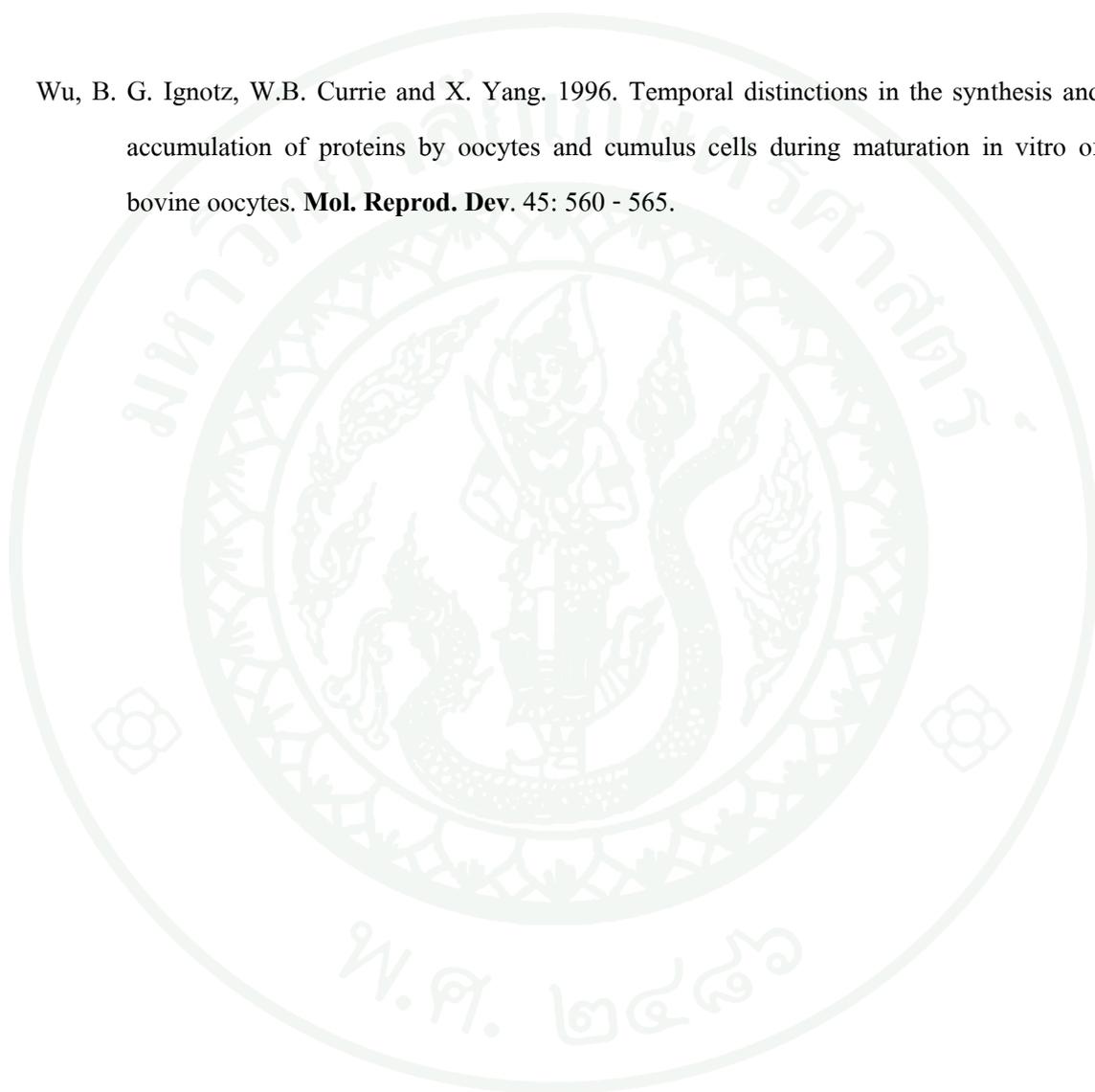
- Sharma, A. and G.N. Purohit. 2008. Vitrification of immature bubaline cumulus oocyte complexes by the open-pulled straw and conventional straw methods and their subsequent *in vitro* fertilization. **Veterinarni Medicina**, 53(8): 427 - 433.
- Shi, L.-Y., H.-F. Jin, J.-G. Kim, B. M. Kumar, B. Blasubramanian, S.-Y. Choe, G.-J. Rho. 2007. Ultra-structural changes and developmental potential of porcine oocytes following vitrification. **Anim. Reprod. Sci.** 10: 128 - 140.
- Strom Holst, B., B. Larsson, C. Linde-Forsberg and H. Rodriguez-Martinez. 2000. Sperm capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. **J. Reprod. Fert.** 119: 77 - 83.
- Songsasen N. and D.E. Wildt. 2007. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog. **Anim. Reprod. Sci.** 98: 2 - 22
- Spicer, S. S. and B.A. Schulte. 1992. Diversity of cell glycoconjugates show histochemically : A prespective. **J. Histochem Cytochem.** 40: 1 - 38.
- Talaei, T., T. Esmaeelpour, F. Aekiyash and S. Bahmanpour. 2010. Effects of cryopreservation on plasma membrane glycoconjugates of human spermatozoa. **Iran. J. Reprod. Med.** 8: 119 - 124
- Tanghe S, AV. Soom, H. Nauwynck, M. Coryn, A. Minireview. 2002 function of the cumulus ophorous during oocyte maturation, ovulation and fertilization. **Mol. Reprod. Dev.** 61: 414 - 424.
- Techakumphu, M., C. Lohachit and Tantasuparak, C. Intaramongkol and S. Intaramongkol. 2000. Ovarian responses and oocyte recovery in prepubertal swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) calves after FSH or PMSG treatment. **Theriogenology.** 54: 305 - 312.

- Tesarik J. 1996. Fertilization of oocytes by injecting spermatozoa, spermatids and spermatocytes. **Rev. Reprod.** 1: 149–152.
- Turathum, B., K. Saikhun, P. Sangsuwan and Y. Kitiyanant. 2010. Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes. **Reprod. Biol.** 8: 3 - 9.
- Vajta G. P. J. Booth, P. Holm, T. Greve and H. Callesen 1998. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **ryo. Lett.** 18: 191 - 195.
- Vanroose, G., H. Nauwynck, A.V. Soom, M. Ysebaert, G. Charlier, P.V. Oostveldt and A. de Kruif. 2000. Structural aspects of zona pellucida of *in vitro* produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. **Biol. Reprod.** 62: 463 - 469.
- Verini Supplizi, A., M. Monaci, G. Stradaoli, T. Greve and F. Parillo. 1996. Identification of glycoconjugate in the zona pellucida of *in vitro* matured and tubal unfertilized bovine oocyte by lectin histochemistry. **Anim. Reprod. Sci.** 43: 99 - 111.
- Xia, GL., K. Kikuchi, J. Izaike and Y. Izaike. 2000. Short time priming of pig cumulus oocyte complexes with FSH and forskolin in the presence of hypoxanthine stimulates cumulus cells to secrete a meiosis-activating substance. **Theriogenology** 53: 1807 - 1815.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In: **The physiology of reproduction**. E. Knobil J.D Neilleds. New York. Raven Press: 189 - 317.
- Yoon T.K., Kim T.J., Park S.E., Hong S.W., Ko J.J. and H.M. Chung 2003. Live births after vitrification of oocytes in a stimulated *in vitro* fertilization embryo transfer program. **Fertil. Steril.** 79: 1323 - 1326.

Warriach, M. KR. Chohan. 2004. Thickness of cumulus cell layer I a significant factor in meiotic compleme of buffalo oocytes. **J. Vet. Sci.** 5 (3): 247 - 251.

Wassarman, P., J. Chen, N. Cohen, E. Litscher, C. Liu, H. Qi and Z. Williams. 1999. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. **J. Exp. Zool.** 285: 251 - 258.

Wu, B. G. Ignatz, W.B. Currie and X. Yang. 1996. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.** 45: 560 - 565.





**TCM 199 (Stock)**

- |   |        |          |
|---|--------|----------|
| 1. TCM 199 (Sigma, M - 5017)            | 0.9990 | กรัม (g) |
| 2. Na pyruvate (Sigma, P - 5280)        | 0.0056 | กรัม (g) |
| 3. NaHCO <sub>3</sub> (Sigma, S - 5761) | 0.2200 | กรัม (g) |
| 4. Ultra pure water to 100 ml           |        |          |

**TCM199 + 10% Fetal Bovine Serum (FBS)**

- |                              |       |                |
|------------------------------|-------|----------------|
| 1. TCM 199 (Stock)           | 9.00  | มิลลิลิตร (ml) |
| 2. FBS (Gibco – 10270 - 098) | 1.00  | มิลลิลิตร (ml) |
| 3. P - S (Stock)             | 10.00 | นาโนลิตร (µl)  |

**สารละลาย PBS ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย**

- |  |       |          |
|--|-------|----------|
| 1. NaCl  | 1.000 | กรัม (g) |
| 2. KCl   | 0.024 | กรัม (g) |
| 3. NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O | 0.056 | กรัม (g) |
| 4. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 0.024 | กรัม (g) |

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	ชลธิชา ศรีรุ่งเรือง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	22 กรกฎาคม 2527
สถานที่เกิด	อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี
ประวัติการศึกษา	วท. บ. (สัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร) มหาวิทยาลัยศิลปากร
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาประจำปี งบประมาณ 2553 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์